

文章编号: 1003-9015(2021)03-0492-08

新型人血白蛋白分离介质吸附性能及重组人血白蛋白分离

葛程童, 褚文宁, 姚善泾, 林东强

(浙江大学生物物质化工教育部重点实验室, 浙江大学 化学工程与生物工程学院, 浙江 杭州 310027)

摘要: 针对毕赤酵母发酵液中分离重组人血白蛋白(rHSA), 采用新型介质 IAA-CYS, 探讨 HSA 吸附性能, 优化分离条件, 实现 rHSA 高效分离。考察了不同 pH 和盐浓度下 IAA-CYS 介质对 HSA 的吸附, 发现 pH 为 4.5 是最佳条件, HSA 饱和和吸附容量达到 $157.6 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 盐浓度影响较小。测定了不同 NaCl 浓度和线性流速下 IAA-CYS 介质对 HSA 的动态载量, 发现流速影响较大, 合适流速为 $100 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$; 盐浓度影响较小, 无需对酵母发酵液进行稀释预处理, rHSA 动态载量达 $48.3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。进一步优化了发酵液中分离 rHSA, 上样 pH 为 4.5, 上样流速为 $100 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$, 上样量为 $38.6 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 在 pH 为 5.0 和浓度为 $400 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaCl 条件下淋洗, 在 pH 为 8.0 和浓度为 $200 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaCl 条件下洗脱, rHSA 纯度为 90.1%, 收率为 88.6%。结果表明, IAA-CYS 介质分离 rHSA 条件温和, 耐盐性好, 料液无需稀释预处理, 过程简便高效, 具有良好的应用前景。

关键词: 人血白蛋白; 层析介质; 吸附性能; 蛋白分离

中图分类号: Q 819

文献标志码: A

DOI: 10.3969/j.issn.1003-9015.2021.03.014

Adsorption performance of a new resin for human serum albumin and recombinant human serum albumin purification

GE Cheng-tong, CHU Wen-ning, YAO Shan-jing, LIN Dong-qiang

(Key Laboratory of Biomass Chemical Engineering of Ministry of Education, College of Chemical and Biological Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

Abstract: In order to separate recombinant human serum albumin (rHSA) from *Pichia pastoris* fermentation broth, HSA adsorption properties of a new resin IAA-CYS were studied and rHSA was separated from yeast broth after optimization. The adsorption of HSA with the IAA-CYS resin at different pH and salt concentrations was investigated. The results show that pH 4.5 is the best adsorption condition. Saturated adsorption capacity of HSA reached $157.6 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ with little salt effects. The dynamic binding capacities of HSA under different NaCl concentrations and linear velocities were determined. The results indicate that velocity has great effect, and the suitable linear velocity is $100 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$. The salt concentration had little influence, and yeast broth could be directly loaded without dilution. The dynamic binding capacity of rHSA reached $48.3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. The separation of rHSA from yeast broth was further optimized and optimum loading conditions were pH 4.5, velocity $100 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$ and loading amount $38.6 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ resin. After washing with $400 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl at pH 5.0, rHSA was eluted with $200 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl at pH 8.0. The purity of rHSA reached 90.1% while the yield was 88.6%. The results indicate that the separation conditions for rHSA separation with IAA-CYS resin are mild, and the fermentation broth does not need dilution due to good salt tolerance. The process developed is simple and efficient, which indicates that IAA-CYS has good application potential for rHSA separation.

Key words: human serum albumin; chromatography resin; adsorption performance; protein separation

收稿日期: 2020-05-08; 修订日期: 2020-05-28。

基金项目: 国家自然科学基金(21476198, 21776243); 国际科技合作专项(2015DFG42070)。

作者简介: 葛程童(1995-), 男, 浙江杭州人, 浙江大学硕士生。通信联系人: 林东强, E-mail: lindq@zju.edu.cn

1 前 言

人血白蛋白(human serum albumin, HSA)是人血浆中含量最丰富的蛋白质,临床上 HSA 主要用于治疗因失血、创伤、烧伤、整形外科手术及脑损伤引起的低蛋白血症以及肝硬化、肾水肿等恶性病变,在癌症和艾滋病人放化疗的辅助治疗中也有较大需求^[1]。目前治疗用 HSA 只能通过健康人血浆分离得到,由于血浆来源有限, HSA 供给十分紧张,且存在血源性病原体的潜在风险,采用基因工程技术生产重组人血白蛋白(recombinant human serum albumin, rHSA)有助于解决相关问题。rHSA 已在真菌、动物细胞和植物细胞等多种系统中成功表达^[2-4],但发酵液成分非常复杂,除培养基成分外,还含有宿主细胞分泌的蛋白、多肽、脂质、多聚糖和色素等代谢产物,以及宿主细胞破碎后释放的核酸等杂质, rHSA 分离纯化难度大,目前尚未有注射级的 rHSA 产品上市^[5]。此外, pH 对 HSA 结构有较大影响,在 pH 为 4.3~8.0 时, HSA 分子以生理条件下的 N 型结构存在^[6-10]。当 pH 小于 2.7 时, HSA 分子呈延展的 E 型结构;当 pH 为 2.7~4.3 时, HSA 分子呈快速迁移的 F 型结构;当 pH 为 8~10 时, HSA 分子无 α 螺旋结构,呈 B 型结构;当 pH 大于 10 时, HSA 分子呈 A 型结构。因此,分离过程需控制合适 pH,过酸或过碱均会造成 HSA 构象变化,影响生理活性。

阳离子交换层析常用于分离 rHSA,如 Goodey 等^[11]采用阳离子交换介质 SP Sepharose FF 从酿酒酵母发酵液中捕获 rHSA,选择性较低,且离子交换介质耐盐性差,需要稀释料液使得电导率低于 $5.5 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ 。基于多种相互作用的混合模式层析,可以有效组合疏水和静电相互作用,提高分离选择性^[12-15]。李梅彦等^[16]采用混合模式介质 CST-II FF 从毕赤酵母发酵液中分离 rHSA,该介质具有较强的耐盐性,但是选择性不高,在吸附后需要使用高浓度的 NaCl 溶液冲洗,以去除色素、糖、核酸和宿主细胞蛋白等杂质。杨代常等^[17]采用混合模式介质 Cpto MMC 从水稻种子提取物中分离 rHSA,吸附后用浓度为 $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaCl 溶液冲洗,以去除吸附的杂质。Chu 等^[18-19]采用混合模式介质 MX-Trp-650 M 从毕赤酵母发酵液中分离 rHSA,经优化, rHSA 纯度可达到 95%。不过,最佳上样 pH 为 4.0,可能影响 HSA 分子正常构象。Wu 等^[20-21]以色胺为配基的新型混合模式介质,用于酵母发酵液中分离 rHSA, rHSA 单体纯度达到 87.8%。此外,疏水相互作用层析也用于 rHSA 分离,如 Dong 等^[22]采用双水相萃取结合疏水相互作用层析,从毕赤酵母发酵液中分离 rHSA,纯度达 99.1%。为了提高 rHSA 分离效率,研发特异性的新型分离介质,吸附和洗脱 pH 条件温和,且具有耐盐吸附特性,具有重要的意义。

基于计算机分子模拟辅助设计方法,以 HSA 的位点 II 为靶点,本实验室经设计和筛选得到 HSA 的特异性配基吲哚-3-乙酸-半胱氨酸(IAA-CYS),将其偶联于琼脂糖凝胶,制备了新型混合模式介质(IAA-CYS 介质),配基结构见图 1^[23]。本研究基于前期工作,实验考察 IAA-CYS 介质对 HSA 的吸附性能,针对毕赤酵母发酵液电导率较高、pH 对 HSA 结构影响较大的特点,重点关注 pH 和盐浓度对 rHSA 分离的影响,优化分离条件,从毕赤酵母发酵液中高效分离 rHSA。

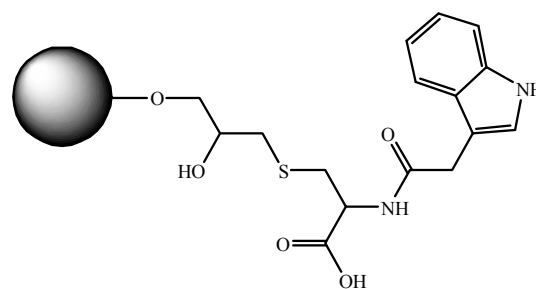


图 1 IAA-CYS 介质的配基结构示意图^[23]
Fig.1 Structure of the IAA-CYS resin ligand^[23]

2 材料与amp;方法

2.1 材料

IAA-CYS 介质:本实验室按照文献方法制备^[20-21,23],以质量分数为 6% 的琼脂糖凝胶为基质,经烯丙基溴活化,偶联 IAA-CYS 配基,配基浓度为 $175 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$,介质粒径为 $45\sim 165 \mu\text{m}$,平均粒径约 $90 \mu\text{m}$; HSA(相对分子量 66 700):Sigma 公司;毕赤酵母发酵液:本地生物制药公司提供, pH 为 6.0, rHSA 质量浓度为 $8 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,纯度 3.9%,电导率为 $20 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$;辛酸钠:上海阿拉丁生化科技股份有限公司;蛋白 Marker:上海天能科技有限公司;毕赤酵母宿主细胞蛋白检测试剂盒: Cygnus 公司;其他为市售分析纯试剂。

2.2 HSA 吸附等温线

配制 20 mmol·L⁻¹ 的乙酸钠缓冲液(pH=4.5)和添加 200 mmol·L⁻¹ NaCl 的 20 mmol·L⁻¹ 的乙酸钠缓冲液(pH 4.5)。IAA-CYS 介质用去离子水充分清洗,并用相应缓冲液平衡 30 min,抽滤 15 min;称取 0.03 g 抽干介质,置于 2 mL 离心管;采用相应缓冲液配制成不同质量浓度(2.4~9.6 mg·mL⁻¹)的 HSA 溶液,分别取 0.8 mL 加入离心管中;将离心管放入 25 °C、转速为 1 200 r·min⁻¹ 恒温混匀仪振荡 3 h,达到吸附平衡;以 3 000 r·min⁻¹ 的转速离心 2 min,沉降介质;用 One Drop OD-1000⁺ 分光光度计测定上清液在 280 nm 波长下的吸光度,根据标准曲线得到 HSA 的平衡浓度 C(mg·mL⁻¹)。根据物料衡算计算 IAA-CYS 介质对 HSA 的吸附量 Q(mg·mL⁻¹)。采用 Langmuir 吸附平衡式对吸附等温线进行拟合,得到饱和吸附容量 Q_m(mg·mL⁻¹)和结合常数 K_a(mL·mg⁻¹)。Langmuir 吸附平衡式如下:

$$Q = \frac{Q_m \times C}{C + 1/K_a} \quad (1)$$

2.3 HSA 动态载量

1 mL IAA-CYS 介质装填于 Tricorn 5/50 层析柱(内径 5 mm, GE Healthcare 公司),填充高度 5 cm。以质量浓度为 10 mg·mL⁻¹ 的 HSA 溶液(pH 4.5)或含有浓度为 200 mmol·L⁻¹ NaCl 的质量浓度为 10 mg·mL⁻¹ 的 HSA 溶液(pH=4.5)作为上样料液。上样前,用平衡缓冲液充分平衡介质。上样流速分别为 100、200 和 300 cm·h⁻¹。UV_{280 nm} 在线检测层析柱出口处的 HSA 浓度变化,绘制穿透曲线,计算 10% 穿透时 IAA-CYS 介质对 HSA 的动态载量 DBC_{10%}(mg·mL⁻¹)。上样结束后,用 20 mmol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液(pH 8.0)洗脱 HSA,再用 0.1 mol·L⁻¹ 的 NaOH 溶液进行介质清洗和再生。

2.4 毕赤酵母发酵液预处理

离心去除发酵液中的毕赤酵母细胞,上清液中加入辛酸钠至 20 mmol·L⁻¹ 浓度,68 °C 水浴 30 min,沉淀杂蛋白和灭活蛋白酶,迅速冷却至室温,滴加乙酸溶液调节 pH 至 4.5,以转速 1 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,0.45 μm 滤膜过滤,得到毕赤酵母发酵处理液,rHSA 质量浓度为 7.6 mg·mL⁻¹,纯度为 4.0%。

2.5 rHSA 动态载量

1 mL IAA-CYS 介质装填于 Tricorn 5/50 层析柱中,填充高度为 5 cm。用 20 mmol·L⁻¹ 的乙酸钠缓冲液(pH 4.5,含 200 mmol·L⁻¹ 的 NaCl)平衡床层,以毕赤酵母发酵处理液为上样料液,上样流速为 100 cm·h⁻¹。每 0.5 mL 收集流穿组分,用 SEC-HPLC 分析流穿液中的 rHSA 浓度,绘制穿透曲线,计算 10% 穿透时 IAA-CYS 介质对 rHSA 的动态载量。上样结束后,用 20 mmol·L⁻¹ 的磷酸盐缓冲液(pH 8.0)洗脱 rHSA,再用 0.1 mol·L⁻¹ 的 NaOH 溶液进行介质清洗和再生。

2.6 洗脱条件优化

采用 20 mmol·L⁻¹ 的乙酸钠缓冲液(pH 5.0)、20 mmol·L⁻¹ 的磷酸盐缓冲液(pH 6.0、7.0、8.0)和 20 mmol·L⁻¹ 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液(pH 9.0)配制不同 pH 和 NaCl 浓度(200、400、600、800、1 000 mmol·L⁻¹)的缓冲液。96 孔过滤板的 30 个孔中分别加入 80 μL IAA-CYS 介质悬浮液(含有 8 mg 介质),真空抽滤;各孔介质用 200 μL、20 mmol·L⁻¹ 的乙酸钠缓冲液(pH 4.5,含 200 mmol·L⁻¹ 的 NaCl)平衡 3 次,真空抽滤,去除缓冲液;各孔加入 48 μL 毕赤酵母发酵处理液,用封板膜密封 96 孔过滤板的顶部和底部,放入 25 °C、1 200 r·min⁻¹ 恒温混匀仪振荡 20 min,真空抽滤;用 200 μL、20 mmol·L⁻¹ 的乙酸钠缓冲液(pH 4.5,含 200 mmol·L⁻¹ 的 NaCl)清洗介质 2 次;各孔加入不同 pH 和 NaCl 浓度的缓冲液,用封板膜密封 96 孔过滤板的顶部和底部,放入 25 °C、转速为 1 200 r·min⁻¹ 恒温混匀仪振荡 10 min,真空抽滤,收集洗脱液,重复 2 次,合并洗脱液。用 SEC-HPLC 分析上样料液和洗脱液,计算 rHSA 纯度和收率。

2.7 毕赤酵母发酵液中分离 rHSA

1 mL IAA-CYS 介质装填于 Tricorn 5/50 层析柱。20 mmol·L⁻¹ 乙酸钠缓冲液(pH 4.5,含 200 mmol·L⁻¹ 的 NaCl)平衡介质,以毕赤酵母发酵处理液为上样料液,上样量为 38.6 mg·mL⁻¹,上样流速为 100 cm·h⁻¹;上样后先用 20 mmol·L⁻¹ 的乙酸钠缓冲液(pH 4.5,含 200 mmol·L⁻¹ 的 NaCl)淋洗,再用 20 mmol·L⁻¹ 的磷

酸盐缓冲液(pH 8.0, 含 $200 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaCl)洗脱 rHSA, 收集洗脱液; 最后用 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaOH 溶液进行介质清洗和再生。采用 SDS-PAGE、SEC-HPLC 和 ELISA 试剂盒分析上样料液和洗脱液。

2.8 SDS-PAGE 分析

将 $10 \mu\text{L}$ 电泳缓冲液与 $40 \mu\text{L}$ 样品混合, $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 金属浴 10 min 。分离胶浓度为 10% , 浓缩胶浓度为 5% , 样品上样量为 $10 \mu\text{L}$, 蛋白 Marker 上样量为 $5 \mu\text{L}$, 80 V 恒压电泳 30 min , 120 V 恒压分离 45 min , 考马斯亮蓝染色, 采用 Quantity One 软件(Bio-Rad 公司)分析凝胶图像。

2.9 SEC-HPLC 分析

采用 TSK G3000SW_{XL} 分析柱(TOSOH 公司)和 LC-10A 液相色谱仪(岛津公司), 流动相为 $0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液(pH 7.0, 异丙醇体积分数为 1%), 流速为 $0.6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 上样体积为 $20 \mu\text{L}$, 检测波长为 280 nm , 室温下进行。

2.10 ELISA 分析

按照毕赤酵母宿主细胞蛋白检测试剂盒说明书进行。

3 结果与讨论

3.1 HSA 吸附等温线

考察了 pH 和盐浓度对 IAA-CYS 介质吸附 HSA 的影响, 发现在 pH 为 $4.0\sim 5.0$ 和 NaCl 浓度为 $0\sim 1.0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, HSA 吸附量均高于 $100 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 最合适的吸附 pH 为 4.5 。进一步测定了 pH 为 4.5 条件下, 不添加 NaCl 和添加浓度为 $200 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaCl 时 IAA-CYS 介质对 HSA 的吸附等温线, 结果见图 2。pH 为 4.5 和不添加 NaCl 时, HSA 饱和吸附容量高达 $157.6 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 结合常数为 $7.1 \text{ mL}\cdot\text{mg}^{-1}$ 。褚文宁等^[18-19]测定了 4 种商业化混合模式介质 (Capto adhere、Capto MMC、MX-Trp-650M 和 Nuvia cPrime)

对 HSA 的吸附性能, 最佳吸附的 pH 分别为 8.5 、 4.0 、 4.0

和 4.0 ; 吴启赐等^[20-21]研发了混合模式新介质 TA-B-6FF, 也测定了 HSA 吸附性能, 最佳吸附 pH 为 5.0 。

与上述 5 种混合模式介质比较, 在各自的最佳吸附 pH 条件下, IAA-CYS 介质对 HSA 的饱和吸附容量最高。pH 为 4.5 和添加 $200 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaCl 时, IAA-CYS 介质对 HSA 的饱和吸附容量降到 $119.8 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 结合常数增大到 $12.5 \text{ mL}\cdot\text{mg}^{-1}$ 。与上述 5 种混合模式介质比较, 发现相同条件下 IAA-CYS 介质的饱和吸附容量高于 Capto adhere、Nuvia cPrime 和 TA-B-6FF, 与 Capto MMC 介质接近, 略低于 MX-Trp-650M 介质, 且吸附 pH 较为温和, 有利于维持 HSA 的正常生理构象^[6-8]。结果表明, IAA-CYS 介质对 HSA 吸附容量高, 条件温和, 耐盐性好。

3.2 HSA 动态载量

考察了 pH 为 4.5 , 不同 NaCl 浓度和线性流速下 IAA-CYS 介质对 HSA 的动态载量, 穿透曲线见图 3, 10% 穿透的动态载量比较见图 4。当线性流速为 $100 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$ 、不添加 NaCl 时, HSA 动态载量达到 $59.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。与 Capto adhere、Capto MMC、MX-Trp-650M、Nuvia cPrime 和 TA-B-6FF 等 5 种混合模式介质比较, 在各自最佳吸附 pH 条件下, IAA-CYS 介质的动态载量高于 Capto MMC、MX-Trp-650M 和 Nuvia cPrime 介质, 略低于 Capto adhere 介质和 TA-B-6FF 介质。添加 $200 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaCl 时, HSA 动态载量仍较高, 达到 $55.2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 高于上述 5 种混合模式介质在相同条件下的 HSA 动态载量。结果表明, NaCl 浓度对 HSA 动态载量影响较小, 进一步证实 IAA-CYS 介质具有较强的耐盐吸附特性。毕赤酵母发酵液的电导率与 $200 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 溶液相当, 故无需对发酵液进行稀释处理, 可以直接上样分离。

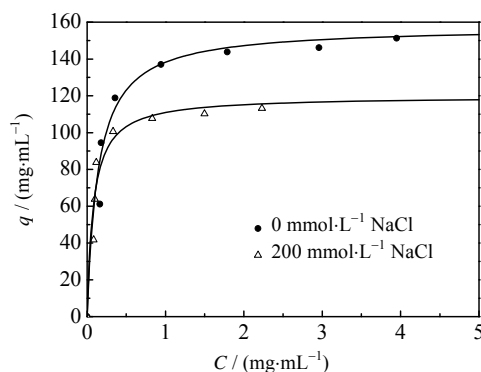


图2 IAA-CYS 介质对 HSA 的吸附等温线(pH 4.5)
Fig.2 Adsorption isotherm curves of HSA on IAA-CYS at pH 4.5

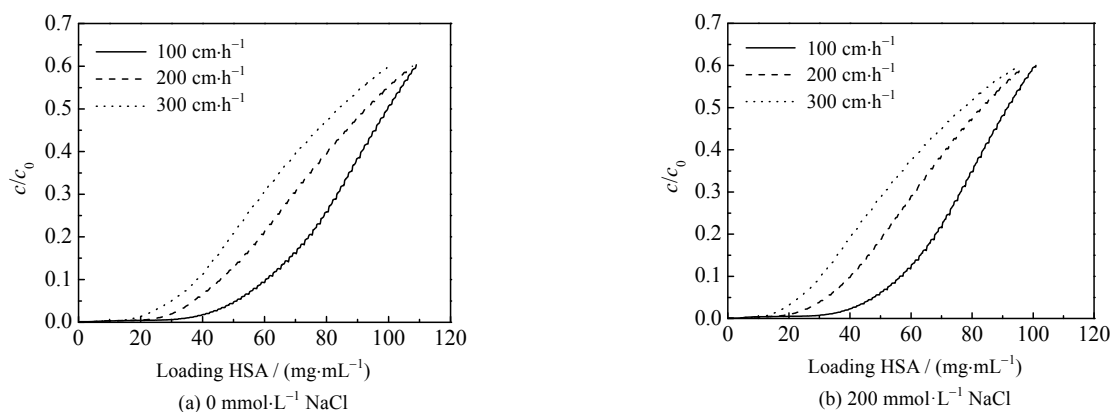


图3 不同线性流速下 IAA-CYS 介质对 HSA 的穿透曲线

Fig.3 Breakthrough curves of HSA on IAA-CYS at different linear velocities

从图4可知,线性流速对HSA动态载量影响较大。不添加NaCl,线性流速从100增大到200 $\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$,HSA动态载量从59.1下降到44.8 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,下降了24.2%;当线性流速继续增大至300 $\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$,HSA动态载量降至37.2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,仅为线性流速100 $\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$ 时的62.9%。因此,采用IAA-CYS介质从发酵液中分离rHSA,合适的上样流速为100 $\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$ 。

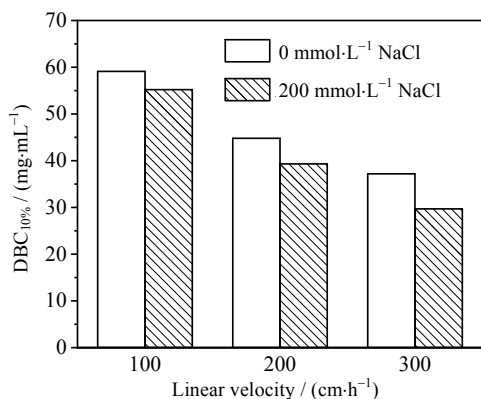


图4 IAA-CYS 介质对 HSA 的 10% 穿透动态载量比较(pH 4.5)

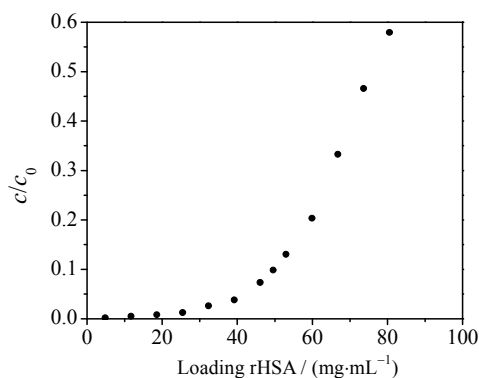
Fig.4 Comparison of $\text{DBC}_{10\%}$ of IAA-CYS resins for HSA adsorption at pH 4.5

图5 IAA-CYS 介质对 rHSA 的穿透曲线(pH 4.5)

Fig.5 Breakthrough curve of rHSA on IAA-CYS at pH 4.5

3.3 rHSA 动态载量

以毕赤酵母发酵处理液为料液,上样 pH 为 4.5,上样流速为 100 $\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$,考察了 IAA-CYS 介质对 rHSA 的动态载量。穿透曲线见图 5,10% 穿透的动态载量为 48.3 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,比纯 HSA 降低了 12.5%,可能是由于发酵液中部分杂质影响了 rHSA 吸附。后续分离时,选取上样量为动态载量的 80%,即 38.6 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。比较发现,IAA-CYS 介质对 rHSA 的动态载量高于 Nuvia cPrime 和 TA-B-6FF 介质,接近 Capto MMC 介质和 MX-Trp-650M 介质。

3.4 洗脱条件优化

以毕赤酵母发酵处理液为料液,IAA-CYS 介质在 pH 为 4.5 条件下吸附 rHSA,然后以不同 pH 和 NaCl 浓度的缓冲液洗脱,考察了 pH 和盐浓度对 rHSA 洗脱的影响,不同洗脱条件的 rHSA 纯度和收率见图 6 和 7。

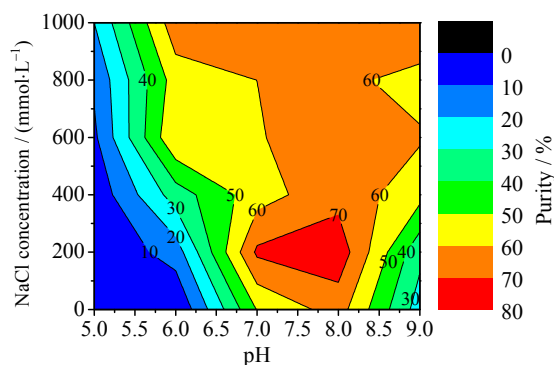


图6 不同洗脱 pH 和 NaCl 浓度下的 rHSA 纯度

Fig.6 rHSA purities at different elution pH values and NaCl concentrations

比较 rHSA 纯度发现, 不添加 NaCl, 洗脱 pH 从 5.0 升高到 8.0, rHSA 纯度逐步增大到 64.5%; pH 从 8.0 升高到 9.0, rHSA 纯度减小为 25.3%; 相对而言, pH 8.0 洗脱的 rHSA 纯度最高。对于不同 NaCl 浓度 ($0\sim 1.0\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$), pH 为 8.0 条件下洗脱的 rHSA 纯度均为最高。在 pH 为 8.0 下, 随着 NaCl 浓度从 0 升高到 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, rHSA 纯度先增大后降低。比较而言, 合适的洗脱条件为 pH 为 8.0、NaCl 浓度为 $200\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, rHSA 纯度最高, 达到 76.1%。比较 rHSA 收率发现, 在 pH 为 5.0~9.0 时, rHSA 收率随着 NaCl 浓度的升高而增大; NaCl 浓度在 $0\sim 1.0\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 随着 pH 升高, rHSA 收率先增大后减小, pH 为 8.0 下的 rHSA 收率最大。比较而言, pH 为 8.0、NaCl 浓度为 200、400 和 $600\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 rHSA 收率较大, 分别为 88.1%、88.7% 和 89.4%。

综合考虑, 在 pH 为 8.0、NaCl 浓度为 $200\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 下洗脱最合适, 具有较高的 rHSA 纯度和收率。

3.5 毕赤酵母发酵液中分离 rHSA

根据前文优化结果, 以毕赤酵母发酵处理液为料液, 进行了 rHSA 分离。上样 pH 为 4.5, 上样流速为 $100\text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$, 上样量为 $38.6\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 洗脱条件为 pH 为 8.0 和 NaCl 浓度为 $200\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

采用 SDS-PAGE 分析料液和洗脱液, 发现料液的主要杂蛋白相对分子量约为 45 000 和 36 000, 前者可能是 rHSA 的降解片段。采用 SEC-HPLC 分析料液和洗脱液, 结果见图 8。分析料液的 SEC-HPLC 图谱, 发现 rHSA 峰的洗脱时间为 16.5 min, 在主峰右边有明显的肩峰, 与 SDS-PAGE 分析结果一致, 可能是 rHSA 的降解片段; 20~28 min 洗脱时间的杂质峰较大, 主要是一些小分子杂质。洗脱液的 SEC-HPLC 图谱中未见明显的小分子杂质峰, rHSA 收率为 84.6%, 纯度为 80.2%, 经 IAA-CYS 层析分离 rHSA 纯度提高了 19.3 倍。采用 ELISA 分析了料液和洗脱液中的宿主细胞蛋白含量, 分别为 $2\ 614.0$ 和 $714.2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 减小了 72.7%。

为了进一步提高 rHSA 纯度, 考虑在洗脱前添加淋洗步骤, 以除去部分吸附的杂质。系统比较了不同 pH 和 NaCl 浓度的洗脱条件, 经 SEC-HPLC 分析发现, pH 为 5.0、 $400\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaCl 条件下的洗脱液中不含 rHSA 且小分子杂质含量较高, 是较好的淋洗条件。因此, 采用前文相同的吸附和洗脱条件, 洗脱前添加淋洗步骤, 洗脱液的 SEC-HPLC 分析结果见图 8, rHSA 收率为 88.6%, 纯度提高到 90.1%, 洗脱液中的宿主细胞蛋白含量降为 $651.3\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

褚文宁等^[18-19]考察了 SP Sepharose FF、Nuvia cPrime、Capto MMC 和 MX-Trp-650M 从毕赤酵母发酵液中分离 rHSA, 发现 SP Sepharose FF 和 Nuvia cPrime 分离 rHSA 的纯度均较低, 仅 82% 左右, 且 SP Sepharose FF 分离需要对料液进行稀释预处理; 采用 Capto MMC 和 MX-Trp-650M 分离效果较好, rHSA 收率和纯度均较高, 大于 95%, 不过最佳上样 pH 为 4.0。文献报道, 当 pH 为 4.0 时 HSA 分子呈快速迁移的 F 型结构, 与生理条件下的 N 型结构有较大区别^[6-8]。此外, 采用 Capto MMC 分离, 洗脱 pH 为 9.0, 对 HSA 分子结构也有一定程度影响^[6-8]。吴启赐等^[20-21]采用 TA-B-6FF 从毕赤酵母发酵液中分离 rHSA, rHSA 单体纯度达到 87.8%, 收率 98.5%, 不过介质耐盐性较差, 对于酵母发酵液的吸附容量较低, 上样量仅为 $7.2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 介质。比较而言, 本研究采用 IAA-CYS 介质进行分离, 上样 pH 为 4.5, 洗脱 pH 为

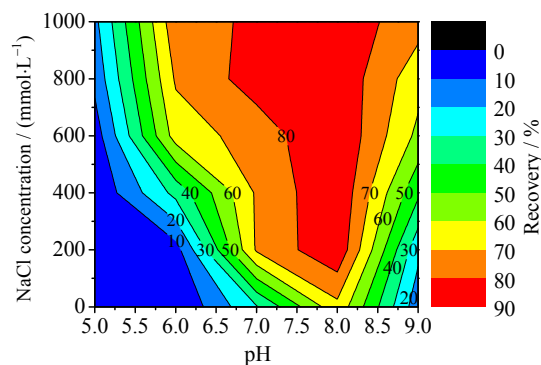


图 7 不同洗脱 pH 和 NaCl 浓度下的 rHSA 收率

Fig.7 Recoveries of rHSA at different elution pH values and NaCl concentrations

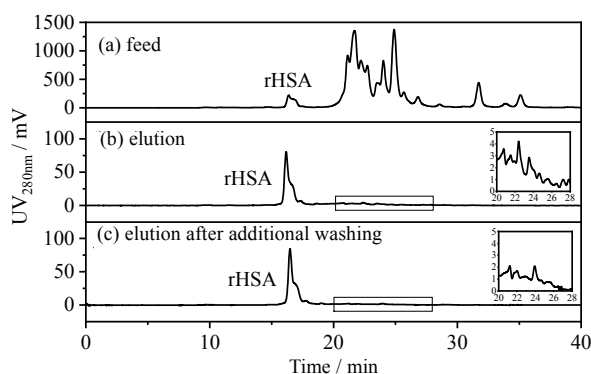


图 8 SEC-HPLC 分析

Fig.8 Results of SEC-HPLC analysis

8.0, 有利于保持 HSA 的正常生理构象, 且每毫升介质的上样量达到 38.6 mg。

总体来说, IAA-CYS 介质用于从毕赤酵母发酵液分离 rHSA, 上样和洗脱条件温和, 上样量较大, 耐盐性好, 料液不用稀释预处理, 且分离得到的 rHSA 纯度和收率均较高。结果表明, IAA-CYS 介质具有良好的应用前景。

4 结 论

针对新型混合模式介质 IAA-CYS, 探讨了 HSA 吸附性能, 优化了吸附和洗脱条件, 实现从毕赤酵母发酵液中高效分离 rHSA。系统考察了 pH 和盐对 IAA-CYS 介质吸附 HAS 的影响, 经优化, 酵母发酵液中分离 rHSA 的最佳上样条件为 pH 4.5, 流速 $100 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$, 每毫升介质的 rHSA 上样量为 38.6 mg; 淋洗条件为 pH 5.0 和 $400 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl; 洗脱条件为 pH 8.0 和 $200 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, 得到 rHSA 纯度为 90.1%, 收率为 88.6%。IAA-CYS 介质分离 rHSA 条件温和, 过程简便, 应用前景良好。

参考文献:

- [1] RABBANI G, AHN S N. Structure, enzymatic activities, glycation and therapeutic potential of human serum albumin: A natural cargo [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 123: 979-990.
- [2] WU X J, LIN Y L, XIONG F Y, *et al.* The extremely high level expression of human serum albumin in the milk of transgenic mice [J]. *Transgenic Research*, 2012, 21(6): 1359-1366.
- [3] SUN Q Y, DING L W, LOMONOSSOFF G P, *et al.* Improved expression and purification of recombinant human serum albumin from transgenic tobacco suspension culture [J]. *Journal of Biotechnology*, 2011, 155(2): 164-172.
- [4] CHEPEREGIN S E, EFREMOV B D, KOZLOV D G. Precipitation of human serum albumin from yeast culture liquid at pH values below 5 [J]. *Protein Expression and Purification*, 2010, 72(2): 205-208.
- [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] TANKOVSKAIA S, ABROSIMOVA K, PASTON S. Spectral demonstration of structural transitions in albumins [J]. *Journal of Molecular Structure*, 2018, 1171(8): 243-252.
- [7] DOCKAL M, CARTER D, RUEKER F. Conformational transitions of the three recombinant domains of human serum albumin depending on pH [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(5): 3042-3050.
- [8] PETERS JR. T. *All about albumin: biochemistry, genetics, and medical applications* [M]. San Diego: Academic Press, 1996.
- [9] 余晶梅, 林东强, 童红飞, 等. 荧光探针法研究牛血清白蛋白和免疫球蛋白的表面疏水特性 [J]. *高校化学工程学报*, 2014, 28(4): 771-776.
- [10] YU J M, LIN D Q, TONG H F, *et al.* Studies on surface hydrophobicity of bovine serum albumin and immunoglobulin by a fluorescence probe method [J]. *Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities*, 2014, 28(4): 771-776.
- [10] 陈诗伟, 徐英年, 胡英. 双水相亲和分离人体血清蛋白质的研究 [J]. *高校化学工程学报*, 1991, 5(3): 203-211.
- [10] CHEN S W, XU Y N, HU Y. Separation of human serum protein by aqueous two-phase affinity [J]. *Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities*, 1991, 5(3): 203-211.
- [11] GOODEY A R, SLEEP D, VANURK H, *et al.* Process of high purity albumin production: US, 6638740 [P]. 2003-10-02.
- [12] LI M T, ZHANG Q L, LIN D Q, *et al.* Development and application of hydrophobic charge-induction chromatography for bioseparation [J]. *Journal of Chromatography B*, 2019, 1134-1135: 1-8.
- [13] ZHANG K, LIU X D. Mixed-mode chromatography in pharmaceutical and biopharmaceutical applications [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2016, 128: 73-88.
- [14] 武强, 林东强, 翁叶靖, 等. 用于双水相萃取的混合模式配基制备及对 IgG 分配的影响 [J]. *高校化学工程学报*, 2013, 27(6): 925-930.
- [14] WU Q, LIN D Q, WENG Y J, *et al.* Preparation of mixed-mode ligand for aqueous two-phase extraction and the influences of the ligand on IgG partitioning [J]. *Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities*, 2013, 27(6): 925-930.
- [15] 姚善泾, 高栋, 林东强. 一种新的生物分离方法——混合模式吸附层析 [J]. *化工学报*, 2007, 58(9): 2169-2177.
- [15] YAO S J, GAO D, LIN D Q. Novel technology in bioseparation process-mixed-mode chromatography [J]. *Journal of Chemical Industry and Engineering (China)*, 2007, 58(9): 2169-2177.
- [16] 李梅彦, 贾茜, 张炜等. 一种纯化 rHSA 的方法: CN, 1854155 [P]. 2006-11-01.
- [16] LI M Y, JIA Q, ZHANG W, *et al.* Method for rHSA purification: CN, 1854155 [P]. 2006-11-01.

- [17] 杨代常, 何洋, 李光飞. 一种从水稻种子中分离纯化重组人血清白蛋白的方法: CN, 201010606635.8 [P]. 2012-07-04.
YANG D C, HE Y, LI G F. Method for separating recombinant human serum albumin from rice seeds: CN, 201010606635.8 [P]. 2012-07-04.
- [18] CHU W N, WU Q C, ZHANG Q L, *et al.* High-throughput process development for recombinant human serum albumin separation from *Pichia pastoris* broth with mixed-mode chromatography [J]. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, 2019, 58(8): 3238-3248.
- [19] CHU W N, WU Q C, YAO S J, *et al.* High-throughput screening and optimization of mixed-mode resins for human serum albumin separation with microtiter filter plate [J]. **Biochemical Engineering Journal**, 2018, 131: 47-57.
- [20] WU Q C, ZHANG Q L, XU S W, *et al.* Preparation and evaluation of mixed-mode resins with tryptophan analogues as functional ligands for human serum albumin separation [J]. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, 2017, 27(7): 898-905.
- [21] WU Q C, LIN D Q, SHI W, *et al.* A mixed-mode resin with tryptamine ligand for humanserum albumin separation [J]. **Journal of Chromatography A**, 2016, 1431: 145-153.
- [22] DONG Y S, ZHANG F, WANG Z M, *et al.* Extraction and purification of recombinant human serum albumin from *Pichia pastoris* broths using aqueous two-phase system combined with hydrophobic interaction chromatography [J]. **Journal of Chromatography A**, 2012, 1245: 143-149.
- [23] 林东强, 葛程童, 褚文宁, 等. 以羧基和吲哚基为功能基团的混合模式层析介质: CN, 201910917553.6[P]. 2020-01-14.
LIN D Q, GE C T, CHU W N, *et al.* Mixed-mode chromatography resins with carboxyl and indolyl as functional groups: CN, 201910917553.6[P]. 2020-01-14.