

生物育种与工艺优化

乳腺生物反应器表达的重组人抗凝血酶III的分离纯化

王翠杰^{1,2}, 黄永东², 孔英俊², 罗坚², 张贵锋², 赵东旭¹, 苏志国², 马光辉²

1 北京理工大学生命学院, 北京 100086

2 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 100190

王翠杰, 黄永东, 孔英俊, 等. 乳腺生物反应器表达的重组人抗凝血酶III的分离纯化. 生物工程学报, 2014, 30(10): 1634-1638.

Wang CJ, Huang YD, Kong YJ, et al. Purification of recombinant human antithrombin III expressed in a goat mammary bioreactor. Chin J Biotech, 2014, 30(10): 1634-1638.

摘要: 抗凝血酶III (AT III)是人体内最重要的抗凝血物质, 利用转基因技术生产重组人抗凝血酶III (rhAT III)受到了越来越多的关注, 如何有效地将rhAT III从转基因羊奶中分离纯化出来是实现其产业化的关键所在。本研究建立了基于等电点沉淀和肝素亲和层析的纯化工艺, 实现了rhAT III的高效、快速纯化。先用等电点沉淀法, 快速去除了占总蛋白50%左右的酪蛋白; 然后用肝素亲和层析纯化rhAT III, 并系统考察了pH值和温度对rhAT III稳定性的影响, 以及pH值和操作条件(洗脱梯度、流速和上样量)对rhAT III分离效果的影响。在优化的条件下, rhAT III纯度达到99%以上, 蛋白收率达到90%, 活性收率约为50%。所建立的纯化工艺简单、快速, rhAT III收率高, 为今后工艺放大提供了重要的依据和参考。

关键词: 乳腺生物反应器, 重组人抗凝血酶III, 肝素亲和层析, 分离纯化

Purification of recombinant human antithrombin III expressed in a goat mammary bioreactor

Cuijie Wang^{1,2}, Yongdong Huang², Yingjun Kong², Jian Luo², Guifeng Zhang², Dongxu Zhao¹, Zhiguo Su², and Guanghui Ma²

1 School of Life Science and Technology, Beijing Institute of Technology, Beijing 100086, China

2 National Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

Abstract: Antithrombin III (AT III) is the most important anti-clotting substance. Recombinant human antithrombin III (rhAT III) expressed in transgenic goat milk attracts more and more attention. Develop an effective purification route for rhAT III is vital to its industrial production. An efficient purification method was developed for the rapid purification of rhAT III by isoelectric precipitation and heparin affinity chromatography. First, casein was effectively removed by isoelectric precipitation. rhAT III was further purified by heparin affinity chromatography. In the process of heparin affinity chromatography, the effects of pH and temperature on the stability of rhAT III were studied, and the effects of operating conditions, elution gradient, flow rate and sample loaded, on the purification efficiency were also studied. Under the optimized conditions, the protein recovery of

Received: January 3, 2014; **Accepted:** April 1, 2014

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 20906094, 21306206), Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK2011342).

Corresponding author: Yongdong Huang. Tel: +86-10-82544987; E-mail: ydhuang@ipe.ac.cn
Zhiguo Su. Tel: +86-10-62561817; E-mail: zgsu@ipe.ac.cn

国家自然科学基金 (Nos. 20906094, 21306206), 江苏省自然科学基金 (No. BK2011342) 资助。

网络出版时间: 2014-05-13

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13345/j.cjb.140005.html>

rhAT III was about 90% with purity over 99%, while its activity recovery was about 50%. Such a purification process is very simple and effective, and it would provide a valuable reference for the further scaling-up of industrial production.

Keywords: mammary gland bioreactor, reconstruction human antithrombin III, heparin affinity chromatography, purification

抗凝血酶Ⅲ (Antithrombin III, AT III) 是血浆中最重要的一个抗凝血酶因子^[1], 在维持血液的凝血与抗凝血平衡中起重要作用^[2]。AT III的分子量为58–64 kDa, 等电点为5.1。目前, AT III有3种来源, 从血浆中纯化^[3]、用基因工程细胞生产^[4]和用乳腺生物反应器生产^[5–6]。乳腺生物反应器能够生产出具有正确氨基酸序列的人源蛋白质, 能进行翻译后修饰, 蛋白具有生物活性, 且表达量高, 很容易通过增加饲养动物的规模来获得大量的重组蛋白^[7–8]。因此, 利用乳腺生物反应器生产rhAT III具有广阔的应用前景。

青岛森森实业有限公司开展了利用崂山奶山羊乳腺生物反应器制备药用蛋白的研究工作, 建立了乳腺生物反应器的开发平台^[9–10], 其中利用乳腺生物反应器生产rhAT III已经达到大规模生产的要求, 在此基础上开发一条高效的分离纯化工艺将有助于推进其产业化进程。已有的从转基因羊奶中提取rhAT III的纯化工艺主要包含切向流过滤、肝素亲和层析、超滤、阴离子交换层析、疏水层析和超滤, 总蛋白收率为53%^[5]。该工艺由六步组成, 操作过于繁琐、纯化周期长, 不利于产品的快速、规模化制备和成本控制。

羊奶中的蛋白主要为酪蛋白, 含量超过70%, 本研究首先通过筛选有效的预处理方法, 去除羊奶中的大部分酪蛋白, 再通过肝素亲和层析将rhAT III与其他蛋白分开, 快速有效地将rhAT III提取出来, 减少操作步骤, 提高收率, 为今后的规模化制备提供参考与依据。

1 材料与方 法

1.1 药品、试剂材料与仪器

转基因羊奶 (青岛森森实业有限公司); 血浆抗凝血酶Ⅲ标准品 (Chromogenix, ITA); Heparin QZT 6FF 亲和介质 (国家生化工程技术研究中心, 北京)、DEAE Sepharose FF 阴离子交换介质和 Phenyl Sepharose FF 疏水介质 (GE, USA); 其他试剂均为分析纯。

离心机 H-2050R (湘仪集团); 层析系统 ÄKTA

purifier (GE, USA); 电泳仪 Mini-Protein III (Bio-Rad, USA); 分光光度计 Ultrospec 2100-pro (GE, USA); 450 型酶联免疫检测仪 (Bio-Rad, USA)。

1.2 方法

1.2.1 转基因羊奶预处理

取出适量保存在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的转基因羊奶, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 融化后离心 ($10\ 000\times\text{g}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 min), 去除沉淀和漂浮的奶脂, 留上清液备用。

等电点沉淀法: 往上清液中加入等体积去离子水, 然后用 1 mol/L 盐酸调 pH 至 4.6。静置沉淀 1 h 后离心 ($10\ 000\times\text{g}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 min), 上清用 $0.45\ \mu\text{m}$ 的滤膜过滤, 调 pH 备用。

乙二胺四乙酸 (EDTA) 沉淀法、钙离子 (Ca^{2+}) 沉淀法和锌离子 (Zn^{2+}) 沉淀法: 分别往上清液中加入等体积 20 mmol/L EDTA、 40 mmol/L CaCl_2 和 40 mmol/L ZnCl_2 溶液, 静置沉淀 1 h 后离心 ($10\ 000\times\text{g}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 min), 上清用 $0.45\ \mu\text{m}$ 的滤膜过滤, 调 pH 备用。

1.2.2 溶液条件对 rhAT III 稳定性的影响

分别考察 rhAT III 在不同 pH (4.6、6.2、7.2、8.2 和 9.2) 和温度 ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$) 下的活性变化情况。

1.2.3 rhAT III 分离纯化

1) 不同层析模式纯化效果考察

DEAE 阴离子交换层析: DEAE 阴离子交换柱 ($6.37\text{ cm}\times 1.0\text{ cm I.D.}$, CV = 5.0 mL) 用平衡缓冲液 Buffer A (20 mmol/L PB, pH 7.2) 平衡后进料 10 mL 上清液, 继续用缓冲液 A 淋洗至基线, 再采用线性梯度 (0–100% 缓冲液 B (20 mmol/L PB+ 1 mol/L NaCl, pH 7.2), 60 min) 洗脱。

Phenyl 疏水层析: Phenyl 疏水柱 ($6.37\text{ cm}\times 1.0\text{ cm I.D.}$, CV = 5.0 mL) 用平衡缓冲液 Buffer C (20 mmol/L PB+ 1.5 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 7.2) 平衡后进料 10 mL 上清液, 继续用缓冲液 C 淋洗至基线, 再采用线性梯度 (0–100% 缓冲液 D (20 mmol/L PB, pH 7.2), 60 min) 进行洗脱。

Heparin 亲和层析: Heparin 亲和柱 ($6.37\text{ cm}\times 1.0\text{ cm I.D.}$, CV = 5.0 mL) 用平衡缓冲液 E

(50 mmol/L Tris, pH 7.2) 平衡后进料 10 mL 上清液, 继续用缓冲液 E 淋洗至基线, 再采用线性梯度 (0–100%缓冲液 F (50 mmol/L Tris+ 0.5 mol/L NaCl, pH 7.2), 60 min) 进行洗脱。

2) 亲和层析方法优化

在 Heparin 亲和层析过程中, 分别考察了洗脱梯度 (线性梯度和阶跃梯度)、pH (6.2–8.2)、流速 (0.5–2.0 mL/min) 和上样量 (1–4 mL 料液/mL 肝素亲和介质) 对亲和层析效果的影响。

1.3 分析方法

1.3.1 蛋白浓度检测

采用Bradford法进行蛋白浓度测定^[11]。

rhAT III浓度检测: 采用文献报道的方法进行反相色谱分析^[9], 根据rhAT III浓度和峰高的标准曲线计算各样品中的rhAT III浓度。

1.3.2 rhAT III活性检测

采用龚道元等^[12]报道的多肽底物发色法测定 rhAT III的生物活性。

1.3.3 电泳检测

参考Laemmli法进行SDS-PAGE电泳^[13], 采用银染法进行染色^[14]。

2 结果与讨论

2.1 原料预处理

酪蛋白等电点为 4.6, 可利用等电点沉淀法将其沉淀出来。此外, 酪蛋白在羊奶中通过磷酸钙形成稳定胶束存在, 而 EDTA 能够螯合磷酸钙, Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 也能替代磷酸钙, 造成酪蛋白胶束的解聚, 从而沉淀出来。4 种沉淀方法的效果如表 1 所示, 其中等电点沉淀和 Zn^{2+} 沉淀两种方法对 rhAT III 的含量和活性均无太大影响, 但是 Zn^{2+} 沉淀效果并不明显, 只有离心后才能出现澄清的上清液。等电点沉淀后, 分层明显, 上清中总蛋白量减少 50%左右, 在不影响 rhAT III 活性收率的情况下, 有效去除羊奶中的酪蛋白。

表 1 酪蛋白沉淀方法筛选结果

Table 1 Results of casein precipitation methods

Precipitation methods	pI	EDTA	Ca^{2+}	Zn^{2+}
Protein recovery in supernatant (%)	48.9	No precipitation	40.7	67.4
Activity recovery in supernatant (%)	99.3	Undetected	30.3	98.5

2.2 溶液条件对 rhAT III 稳定性的影响

在层析中, 如何保持 rhAT III 的活性是首要解决的问题。pH、温度和时间对 rhAT III 活性保持的影响如图 1 所示。由图 1 可知, pH 对其稳定性影响显著, pH 7.2 的条件对原料的保存最有利, 即使长时间放置 (24 h), rhAT III 活性损失相对最小。此外, 低温 (4 °C) 比室温 (25 °C) 更有利于样品中 rhAT III 的活性保持。因此, 利用等电点沉淀法去除酪蛋白后要尽快把样品 pH 调至中性, 放置于 4 °C 冰箱中, 并尽可能快速地进行后续的纯化实验, 以保证活性收率。

2.3 层析模式对 rhAT III 纯化的影响

离子交换层析和疏水层析具有载量高、介质成本低的优势, 而肝素亲和层析具有特异性高、分离纯化效果好的特点, 上述 3 种层析方法都已用于转基因羊奶中 rhAT III 的分离纯化^[4]。为了简化 rhAT III 的分离纯化步骤, 本文对 3 种层析模式 (采用线性梯度洗脱) 进行比较, 从中筛选出最有效的层析模式。

在离子交换和疏水层析中, 除穿透峰 (P0) 外, 都只有 1 个洗脱峰 (P1, 图略); 而在肝素亲和层析中, 大量杂蛋白直接穿透 (P0), 洗脱时出现两个明显的洗脱峰 (P1, P2), 并且有较好的分离度 (图略)。对层析所得的样品进行电泳分析 (图 2), 离子交换层析和疏水层析并不能很好地将 rhAT III 和其他杂蛋白分开, 而肝素亲和层析的洗脱峰 P1 (Lane 3) 的条带与文献^[13]报道的 rhAT III 的分子量 60 kDa 相符, 为目标蛋白 rhAT III, 纯度达到 85% 以上, 进一步优化洗脱梯度有望达到更好的分离纯化效果。

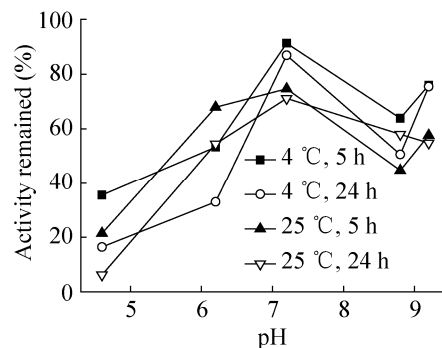


图 1 pH 对 rhAT III 稳定性的影响

Fig. 1 Effect of pH on rhAT III stability.

2.4 溶液条件及洗脱条件对肝素亲和层析纯化效果的影响

2.4.1 洗脱梯度的影响

在线性梯度洗脱的基础上,分别考察不同阶跃梯度(1:0-20%-30%-50%-60%-100%;2:0-50%-100%)的洗脱效果。采用阶跃梯度1,各洗脱梯度下均有洗脱峰,但电泳分析结果表明,20%、30%和50%洗脱梯度对应的洗脱峰无明显区别(图略),均为高纯度的rhAT III,所以没必要把洗脱梯度分得过于精细;直接用0-50%-100%的洗脱梯度可以得到两个洗脱峰(图3),其中50%梯度对应的洗脱峰P1纯度达到电泳纯(图4,泳道5),该方法操作简单,短时间内即可得到高纯度的rhAT III。

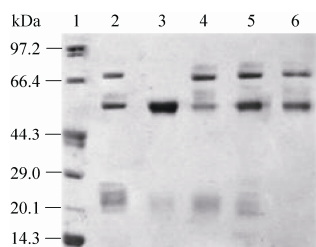


图2 不同层析模式所得样品的SDS-PAGE电泳图
Fig. 2 SDS-PAGE analysis of rhAT III eluted from different chromatography patterns. 1: marker; 2-4: P0, P1 and P2 of heparin affinity chromatography; 5: P1 of DEAE anion chromatography; 6: P1 of phenyl hydrophobic interaction chromatography.

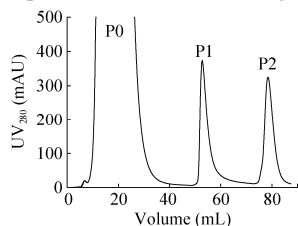


图3 肝素亲和层析谱图
Fig. 3 Chromatogram of heparin affinity chromatography.

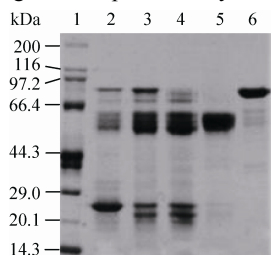


图4 亲和层析样品的SDS-PAGE电泳图
Fig. 4 SDS-PAGE analysis of rhAT III eluted from heparin affinity chromatography. 1: marker; 2: goat milk; 3: supernatant of pH 7.2; 4: P0; 5: P1; 6: P2.

2.4.2 pH的影响

考察不同pH值(pH 6.2、7.2、8.2)对rhAT III分离纯化的影响(采用0-50%-100%洗脱梯度洗脱)。当pH为6.2时,目标洗脱峰P1最大,但其杂质含量也最高;当pH为7.2和8.2时,所得样品的纯度最高,无明显杂质。不同pH条件下目标组分(P1峰)中rhAT III的活性收率分别为20.6%(pH 6.2)、49.7%(pH 7.2)、13.9%(pH 8.2),说明pH不仅影响溶液中rhAT III的活性保持(图1),还对层析过程中rhAT III的活性收率具有显著影响。综合考虑活性收率和纯度,pH 7.2的条件最有利于rhAT III的分离纯化。

2.4.3 流速的影响

不同流速(0.5、1.0、1.5、2.0 mL/min)对层析效果的影响(pH 7.2,采用0-50%-100%的梯度洗脱)如表2所示。流速太低(0.5 mL/min)时,蛋白在柱上停留时间过长,活性收率低;流速太高(2.0 mL/min)时,不利于蛋白的有效吸附,活性收率较低;1.0-1.5 mL/min的流速有利于提高蛋白的活性收率。综合考虑蛋白收率和活性收率,选择1.0 mL/min的操作流速。

2.4.4 上样量的影响

从表3可以看出,1和2 mL料液/mL介质的上样量的效果基本相当;随着上样量的进一步增加,rhAT III的蛋白收率和活性收率都有下降趋势,这主要是因为上样量过高,超过了介质载量,造成部分目标蛋白穿透。综合考虑处理速度、蛋白收率和活性收率,选择2 mL料液/mL介质的上样量。

2.4.5 层析过程(吸附-解吸)对蛋白活性的影响

将50%梯度洗脱所得的P1峰用平衡缓冲液透析后再次进行Heparin亲和层析。结果表明rhAT III的蛋白收率达到95%以上,但活性收率只有68%,存在明显的活性损失现象。荧光光谱分析结果表明,rhAT III再次进行肝素亲和层析后,其最大吸收波长从原来的338.6 nm降低到334.2 nm,发生了蓝移。由此可见,层析过程中的吸附-解吸过程是造成rhAT III结构变化和活性收率低的主要原因。

表2 不同流速条件的rhAT III收率

Flow rate (mL/min)	Protein recovery (%)	Activity yield (%)
0.5	90.3	32.6
1.0	88.3	47.8
1.5	85.3	46.2
2.0	82.3	42.3

表 3 不同上样量的 rhAT III 收率

Table 3 Recovery of rhAT III with different sample loaded

Sample loaded (mL/mL media)	Protein recovery (%)	Activity yield (%)
1.0	99.5	48.2
2.0	94.3	49.5
3.0	70.1	36.0
4.0	63.6	31.4

2.5 rhAT III 结构分析

所纯化的 rhAT III 经胰蛋白酶和 DTT 降解后, 通过液质联用分析其氨基酸序列, 结果表明 rhAT III 的氨基酸覆盖率达到 82.6% (与血浆来源的 AT III 相比); 二硫键定位结果表明 rhAT III 中存在 3 个二硫键位置, 分别是 Cys21-Cys95、Cys8-Cys128、Cys247-Cys430, 与血浆来源的 AT III 一致; 糖基化位点分析结果表明 rhAT III 中存在 4 个糖基化位点, 分别为 Asn96、Asn135、Asn155 和 Asn192, 与血浆来源的 AT III 一致^[15-16]。上述分析结果表明所纯化的 rhAT III 的结构与血浆来源的 AT III 一致, 结构正确。

3 结论

本研究开发了一条基于等电点沉淀和肝素亲和层析纯化 rhAT III 的工艺, 重点考察了溶液条件和操作条件对 rhAT III 蛋白收率和活性收率的影响, 优化了亲和层析的操作条件 (pH 7.2、洗脱梯度为 0–50%–100% Buffer F、流速 1.0 mL/min、上样量 2 mL 料液/mL Heparin 介质), 实现了 rhAT III 的高效纯化, 纯度达到 99% 以上, 蛋白收率为 90%, 活性收率约为 50%。与离子交换和疏水层析相比, 肝素亲和层析具有特异性强、分辨率高、产品回收率高的特点。经过液质联用、圆二色光谱、荧光光谱分析, 所纯化的 rhAT III 与血浆来源 AT III 结构一致^[16]。该工艺简化了 rhAT III 分离纯化的操作步骤, 有利于工艺的进一步放大和产品的规模化制备。

REFERENCES

- [1] Morelli A. Production and clinical use of plasma antithrombin III//Bertolini J, Goss N, Curling J, Eds. Production of Plasma Proteins for Therapeutic Use. New York: Wiley, 2012: 147.
- [2] Mochizuki S, Miyano K, Kondo M, et al. Purification and characterization of recombinant human antithrombin containing the prelatent form in Chinese hamster ovary cells. Protein Expres Purif, 2005, 41: 323–331.
- [3] Hoffman D. Purification and large-scale preparation of antithrombin III. Am J Med, 1989, 87(3): S23–S26.
- [4] Bu S, Wang HM, Sun T, et al. Expression and antiserum preparation of recombinant human antithrombin-III. Chin J Cell Mol Immunol, 2013, 29(2): 174–177 (in Chinese). 卜澍, 王洪梅, 孙涛, 等. 人抗凝血酶 III 的表达及其抗血清的制备. 细胞与分子免疫学杂志, 2013, 29(2): 174–177.
- [5] Edmunds T, Van Patten SM, Pollock J, et al. Transgenically produced human antithrombin: structural and functional comparison to human plasma derived antithrombin. Blood, 1998, 91(12): 4561–4571.
- [6] Dai CY, Huang HJ. Progress of animal mammary gland bioreactor. Modern Agri Sci Technol, 2010, 4: 332–333 (in Chinese). 代长云, 黄海军. 动物乳腺生物反应器研究进展. 现代农业科技, 2010, 4: 332–333.
- [7] Khodarovich YM, Goldman IL, Sadchikova ER, et al. Expression of eukaryotic recombinant proteins and deriving them from the milk of transgenic animals. Appl Biochem Micro, 2013, 49(9): 711–722.
- [8] Niemann H, Kues WA. Transgenic farm animals: an update. Reprodu Fert Develop, 2007, 19(6): 762–770.
- [9] Zou XG, Yuan SP, Xian J, et al. Large scale production of recombinant human antithrombin III (rhAT III) in transgenic cloned goats. Chin J Biotech, 2008, 24(1): 117–123 (in Chinese). 邹贤刚, 袁三平, 鲜建, 等. 转基因克隆山羊大量生产重组人的抗凝血酶 III 蛋白质 (rhAT III). 生物工程学报, 2008, 24(1): 117–123.
- [10] Zou XG, Zhao YL, Yan SP. A recombinant goat fetal fibroblast cell for the expression of antithrombin III: Chinese Patent, 201210362487.9. 邹贤刚, 赵雅琳, 袁三平. 一种表达抗凝血酶 III 的重组羊胎儿成纤维细胞: 中国, 201210362487.9.
- [11] Zhu HC. Guide to Protein Purification and Identification. Beijing: Science Press, 1999: 158–159 (in Chinese). 朱厚础. 蛋白质纯化与鉴定实验指南. 北京: 科学出版社, 1999: 158–159.
- [12] Gong DY, Li ZP, Ling GX. Determination of antithrombin III activity by microassay of chromogenic tripeptide substrate and its clinical application. Jiangxi J Med Lab Sci, 2000, 18(4): 200–202 (in Chinese). 龚道元, 李子萍, 凌光鑫. 微量发色三肽底物法测定抗凝血酶 III 活性及其临床应用. 江西医学检验, 2000, 18(4): 200–202.
- [13] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 1970, 227(259): 680–685.
- [14] Swain M, Ross NW. A silver stain protocol for proteins yielding high resolution and transparent background in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. Electrophoresis, 1995, 16(6): 948–951.
- [15] Carrell R, Stein P, Fermi G, et al. Biological implications of a 3 structure of dimeric antithrombin. Structure, 1994, 2(4): 257–270.
- [16] Kong YJ, Zhang GF, Luo J, et al. Facile purification and characterization of recombinant human antithrombin III from transgenic goat milk. J Chem Technol Biotechnol, 2011, 86(10): 1303–1309.

(本文责编 陈宏宇)