

重组人血清白蛋白生产工艺研究进展

刘永东 王云山 苏志国

(中科院过程工程研究所生化工程国家重点实验室 北京 100080)

摘要:人血清白蛋白是一种重要的临床药物,人源血浆白蛋白可能会传染病原体将逐步被重组白蛋白所代替。对用巴斯德毕赤酵母生产重组人血清白蛋白的表达系统、发酵方法、分离纯化技术以及重组白蛋白的理化及生理特性进行了综述。

关键词:巴斯德毕赤酵母,重组人血清白蛋白,发酵,分离纯化

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 05-0128-05

人血清白蛋白(Human Serum Albumin, HSA)是一个由585个氨基酸组成的单链多肽,分子量66.5kD,分子呈心型^[1]。HSA是人血浆中最丰富的蛋白成分,占血浆总蛋白的60%,主要由肝细胞合成,分泌进入血液循环系统,具有重要的生理功能,主要用于维持血液胶体渗透压和运输脂肪酸、胆红素、乙酰胆碱、药物、染料及金属离子等,是许多内源性和外源性物质的重要载体。临床上白蛋白主要用于输血,补充体液,治疗外伤休克,发烧,白血病,成红细胞增多症,白蛋白过少症等。另外HSA也应用在生物产品的制备上,如作为亲和层析介质纯化胆红素,用作乙肝疫苗的稳定剂及许多药物的辅料等。人血清白蛋白在临床和生物产品的广泛使用,使其在国内外有很大市场,生产白蛋白具有巨大商机。

目前白蛋白商品都由人源血浆提取纯化而得。一方面由于血液供应有限,另一方面由于血液来源中各种传染病病源较多,尤其是爱滋病、乙肝等病毒的蔓延,来自人源血浆的白蛋白在纯化过程中难免将这些病毒带入最终产品。利用基因重组技术生产白蛋白则可避免病毒感染。因此近年来,许多科研工作者一直热衷于重组人血清白蛋白的研究,用rHSA取代血浆白蛋白已成为一种趋势。本文对重组人血清白蛋白生产全过程的研究进展作简要介绍。

1 rHSA 表达系统的研究进展

rHSA最早是1981年在大肠杆菌中获得成功表达。但*E. coli*表达的HSA是一个以甲硫氨酸为N端的人血清白蛋白前源蛋白,它在细胞内形成包涵聚集体,需进行蛋白复性才能与天然白蛋白完全一致^[2]。同时由于HSA分子量较大,在原核生物中表达量不高(毫克级)和分泌效果不够理想,许多研究者转而研究HSA在真核细胞中的表达。随着使用基因重组技术所表达蛋白的复杂性越来越高,酵母作为真核生物具有能对所表达的蛋白进行翻译后修饰,易于大规模培养等优点逐渐取代大肠杆菌生产外源蛋白。在HSA的重组研究过程中,研究人员分别采用了酿酒酵母、汉逊酵母、裂殖酵母、克鲁维氏酵母、毕赤酵母等作为宿主细胞(表1),以及转基因动物、转基因植物来分泌表达重组人血清白蛋白。其中毕赤酵母由于分泌蛋白含量高、表达稳定,目前人们普遍采用毕赤酵母作为rHSA的表达宿主。

收稿日期:2002-08-20, 修回日期:2002-10-31

毕赤酵母是一种甲醇酵母,它可以在以甲醇为唯一碳源和能源的培养基中生长,细胞的过氧化物酶体中含有甲醇代谢途径的必需酶,其中的醇氧化酶(AOX)是甲醇利用途径的第一个酶^[3]。当细胞以葡萄糖、甘油、乙醇为碳源时,不能检测到AOX的活性,而以甲醇为碳源时,该酶可占细胞总蛋白的30%以上。使用巴斯德毕赤酵母表达外源蛋白时,大多采用醇氧化酶AOX为启动子,它的强诱导性使下游的外源基因易于调控,并具有很高的表达率,且一般用整合型质粒作为外源基因的表达载体,外源基因表达稳定。

在rHSA基因工程菌构建方面,研究人员还考察了不同拷贝数对分泌量的影响^[4]。他们的研究表明,rHSA的基因拷贝数与表达量之间的关系规律性不强,表达量并不一定随拷贝数的增加而增加,而且不同培养基对不同拷贝数表达量的影响区别较大。对巴斯德毕赤酵母,现多采用单拷贝数来分泌表达rHSA。

表1 rHSA在不同表达系统中的比较

宿主菌	启动子	表达方式	表达量	参考文献
<i>E. coli</i>	pXL	胞内	<1%	2
Yeast	Chelatin	分泌	6mg/L	5
<i>S. cerevisiae</i>	PHO5	分泌	10mg/L	6
<i>S. cerevisiae</i>	PGK	胞内	>1%	7
<i>K. lactis</i>	KLADH4	分泌	1g/L	8
<i>P. pastoris</i>	AOX1	分泌	4 g/L	9
<i>P. pastoris</i>	AOX2	分泌	1.4g/L	4

2 优化发酵条件,提高rHSA产量

研究表明,某些特殊的添加剂对rHSA表达有明显影响,如油酸和氨基酸。油酸是一种能诱导产生过氧化物酶体的碳源,向以AOX₂为启动子分泌rHSA的*P. pastoris*的培养基中加入0.01% (w/v)的油酸时,rHSA的表达量可提高一倍^[10]。不同氨基酸对rHSA分泌的影响有较大差异,培养基中添加0.1% (W/V)组氨酸能提高rHSA产率3.3~4.4倍^[11]。温度对菌体生长及rHSA表达有明显影响,21℃~23℃rHSA产率最高,但温度过低会增加设备的运转费用。

rHSA的发酵过程包括二个阶段,以甘油为碳源积累生物量的生长期和以甲醇为碳源的rHSA诱导表达期,目前大多省略了中间离心的步骤,而是采用甘油消耗完毕后直接补加甲醇。甲醇的流加速率控制在培养基中的浓度小于1%,一般诱导表达150~300h左右。整个过程的pH控制在6.0左右,溶氧控制在10%以上。采用这种方法生产rHSA的最高表达量国内报道为3.6g/L,国外报道为7g/L左右。在两段法的发酵条件优化方面,发现将甘油和甲醇混合流加可提高rHSA产量,也就是诱导开始时首先流加甲醇,在确保醇氧化酶被诱导后,开始混合流加。混合流加时严格控制甘油和甲醇的浓度比例和流加速率,使发酵液中甘油不积累,同时甲醇浓度不超过0.5%。

采用真核微生物分泌表达外源蛋白时,外源蛋白会被同时分泌的蛋白水解酶所降解。由于生产rHSA时诱导表达时间长,蛋白酶的降解作用尤其不能忽视。通常可使用以下方法消除蛋白酶的影响:①诱导期加入胰蛋白酶或酪氨酸,用于缓解或消除蛋白酶对目标产物的降解。②加入蛋白酶抑制剂。适量Antipain, chymostatin, diisopropyl fluorophosphate, elastatinal, PMSF等均能完全抑制蛋白酶的活性。③修饰宿主细胞,删除编码蛋白酶的PEP4基因。Kaoru等人对rHSA发酵过程中蛋白酶的影响进行了较为详细的研究。他们的研究表明,发酵液中蛋白酶的活性由培养基缺氮引起。当培养基中硫酸铵浓度低于0.3mg/L时,可检测到有较强活性的蛋白酶。通过改进培养基,增加磷酸

浓度,然后补加氨水调节 pH,从而补充氮源。改进后的培养基可使 rHSA 含量在诱导 200h 后达 1.4g/L。用巴斯德毕赤酵母生产 rHSA 的过程中,蛋白酶的活性与 pH 值的高低有密切关系,当 $\text{pH} > 5.9$ 时,发酵液不表现蛋白酶活性; $\text{pH} < 5.6$ 时,发酵液表现出蛋白酶活性,pH 越低,蛋白酶活性越强。因此在纯化 rHSA 时,也应考虑 pH 变化对 rHSA 收率的影响。如先将发酵液加热,使蛋白酶失活后再进行提纯,以避免提纯过程中因 pH 变化造成 rHSA 降解。

3 建立简便、高效的 rHSA 纯化技术

除优化发酵条件,提高 rHSA 的分泌表达水平外,建立简便、高效且易于放大易于自动控制的分离纯化方法也是降低成本,实现 rHSA 大规模生产的关键。

虽然人源血清白蛋白 pHSA 的分离方法比较成熟,但 rHSA 是由微生物分泌产生,其纯化过程中需除去的杂质与 pHSA 纯化过程需除去的杂质有很大差异,因而提取方法也有很大区别。rHSA 纯化过程需除去的杂质除某些剩余培养基成分(无机盐)外,其余均源于宿主细胞,如宿主细胞分泌的杂蛋白、多肽、脂质、多聚糖、热原、色素等代谢产物以及细胞破碎释放出的核酸及胞内物等。

3.1 粗提 rHSA 目前 rHSA 分离纯化方面的研究只有几篇专利有所报道^[12,13],这些方法的主要区别在于前期的初步纯化过程。rHSA 的初步纯化方法主要有两大类,一是采用离心或过滤实现固液分离作为分离纯化的第一步(Filter Press 法),另一是利用层析分离原理直接将发酵液上柱处理(Streamline 法),一般采用扩张床吸附技术,瑞典的 Pharmacia Co. 及日本的 Yoshitomo Pharmaceutical Industries, Ltd. 在 rHSA 的提取过程中均采用了该技术。

3.1.1 Filter Press: 首先通过过滤或离心实现发酵液的固液分离,再通过超滤去除分子量大于 30 万和小于 3 万的杂质,使 rHSA 得到初步纯化。其具体操作步骤为:(1)离心或过滤得发酵上清液;(2)将上清液通过一次超滤膜(300,000),滤出液通过二次超滤膜(30,000),得滤出液 I;(3)将滤出液 I $50^{\circ}\text{C} \sim 70^{\circ}\text{C}$ 加热 30min ~ 5h;(4)热处理后调溶液 pH 为 3 ~ 5,然后通过 300,000 的微滤膜,得滤出液 II;(5)将滤出液 II 上阳离子树脂。

3.1.2 Streamline: 主要采用了装有 Streamline SP 阳离子层析介质的扩张床。预处理后的发酵液直接上扩张床,白蛋白吸附在层析介质上,宿主细胞、细胞碎片及部分杂质不被吸附,直接流出。其具体操作步骤为:(1)直接将发酵液 60°C 加热 30min;(2)将热处理后的发酵液迅速冷却至 15°C ,稀释 2 ~ 4 倍,并用乙酸调 pH4.5。(3)将稀释液通过预先用 pH4.5,盐浓度为 50mmol/LNaCl 的缓冲液平衡的 Streamline SP 扩张床。(4)用同样缓冲液淋洗,然后用 pH9,盐浓度为 100mmol/L 的磷酸盐缓冲液洗脱,收集洗脱液,得粗步纯化的 rHSA 产品。

与 Filter Press 相比,采用 Steamline 具有很多明显的优点,如易于放大,易于自动控制,操作系统封闭,不易被污染等。而且采用 Steamline 的操作周期短,一般为 4d,提取率约为 60%,Filter Press 的方法操作周期长,一般为 6d,提取率约为 45%。

上面二种方法都包含了同样的热处理过程,目的是在不引起 rHSA 变性的条件下使发酵液中的蛋白酶失活。热处理条件为: 60°C ,30min,pH6.0,加入热稳定剂 5mmol/L 辛酸钠或乙酰色氨酸钠。热处理除了能使蛋白酶失活外,还能除去部分色素,可根据

需要一次或多次在不同提取阶段使用。

3.2 rHSA 的进一步纯化 粗提后的 rHSA 纯度可达 90%，必须经过进一步的纯化。rHSA 精制过程主要采用了不同层析吸附法，包括疏水层析、阳离子交换层析、阴离子交换层析、金属螯和亲和层析、亲和染液层析，凝胶过滤等，还可根据需要选用超滤和透析。

3.2.1 疏水层析：用于除去非抗原性的碳水化合物及部分色素。非抗原性的碳水化合物包括：戊糖、己糖、低聚糖、糖醛酸等。疏水层析选用含有烷基或苯基的层析介质，如 Phenyl Cellulofine。层析条件为：pH6.8，0.15mol/L NaCl，在此条件下，杂质被吸附，rHSA 直接流出。

3.2.2 亲和染液层析：去除 45kD 白蛋白片段、酵母抗原和色素。*Pichia pastoris* 分泌 66.7kD 全长的 rHSA 时还分泌 45kD 的白蛋白片段，两者较难分离。但该片段与 Cibacron 蓝染料的吸附强于全长白蛋白，从而利用该特性将两者分开。亲和介质为结合白蛋白的 Cibacron 蓝染料，如活性蓝、蓝琼脂糖等。含 Cu、Ni 配基的金属螯合亲和介质对 rHSA 也有一定的纯化作用。

3.2.3 凝胶渗透层析：用于去除白蛋白二聚体及部分色素，可采用 Sephacryl S-200HR 凝胶等。

3.2.4 阴离子交换层析：去除酵母抗原、碳水化合物和含色素的白蛋白。可选用阴离子交换基质 DEAE-Sepharose FF。上样完毕后，用一定浓度的四硼酸钠溶液洗涤，这可使在洗脱白蛋白组分之前，任何含碳水化合物的杂质更强地粘附在层析柱上。然后用高离子强度的溶液洗脱白蛋白。

在 rHSA 进一步纯化过程中，可根据实际需要选用不同纯化方法的组合，集成一条高效简便的纯化路线，到达纯度要求。

4 rHSA 与 pHSA 的比较

利用生物技术重组微生物表达的 rHSA 与从人血浆中提取的 pHSA 是否完全一致，尤其是否具有相同的生理功能，是决定 rHSA 研究意义的重要指标。日本在这方面也走在了最前面。现已通过多种分析方法证明在分子组成和结构上 rHSA 与 pHSA 完全相同^[14]。Wataru Ohtani 等比较了两者的理化特性及免疫化学特性^[15]。通过测定 pH6.7 ± 0.1 下的 rHSA 的胶体渗透压得到的第二维里系数与 pHSA 无明显不同。在 25% (W/V) 的药用浓度下，rHSA 与 pHSA 的粘度相同，均呈牛顿型流体特性。在脂肪酸含量方面，两者所含脂肪酸种类相同，pHSA 总脂肪酸含量高于 rHSA，而 rHSA 中棕榈酸 (C16: 0) 和硬脂酸 (C18: 0) 的含量高于 pHSA。采用抗-pHSA 多克隆抗体法证明 rHSA 与 pHSA 的免疫化学特性相同。能与多种物质结合是白蛋白的重要生理功能之一，这也是白蛋白活性的体现，Ohmura 等分别以 Bilirubin, Warfarin, lauric acid 代表染料、药物及脂肪酸来考察 rHSA 结合化合物的能力。实验表明，rHSA 与这 3 种物质的结合与 pHSA 一致。由此可见，rHSA 与 pHSA 基本相同，两者具有相同的生理功能，rHSA 可与 pHSA 同样用于临床。

自 1981 年 Lawn R. M. 首次报道重组人血清白蛋白在大肠杆菌 (*E. coli*) 中成功表达以来，国外许多实验室和公司在重组白蛋白方面进行了大量研究，如美国的 GENE-TECH 公司，英国的 DELTA 公司，以及日本的 YOSHITOMI 等。日本在重组人血清白蛋

白方面的研究走在了最前面。1994年日本的 GREEN CROSS (YOSHITOMI 的前身) 公司被批准进入二期临床, YOSHITOMI 公司已经建厂进行大规模生产, 2000年一期工程完毕可达 12.5t/a 的生产能力, 并计划逐步提高到 40t/a, 商品名为“Albrec”, 所生产的产品纯度可达 99.999999%。近一两年来, 我国也掀起了 rHSA 的研究热潮, 目前我国在这方面的研究工作正在发展之中。

参 考 文 献

- [1] 林钧材主编. 血液生物化学. 北京: 人民卫生出版社, 1988. 35~37.
- [2] Martine L, Michael K, Paolo S, *et al.* *Bio/technology*, 1987, 5: 1309~1314.
- [3] 欧阳立明, 张惠展, 张嗣良, 等. 生物化学与生物物理进展, 2000, 27 (2): 151~154.
- [4] Kobayashi K, Kuwae S, Ohya T, *et al.* *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2000, 89 (1): 55~61.
- [5] Elhevery T, Forrester W, Hitzeman R. *Bio/technology*, 1986, 4: 726~730.
- [6] Quirk A V, Geisow W J, Woodrow J R, *et al.* *Biotech Appl Biochem*, 1989, 11: 273~289.
- [7] Sleep D, Belfield G P, Steven J. *Bio/technology*, 1991, 9: 183~187.
- [8] Michele S, Cristina M. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65: 53~60.
- [9] Cregg J M, Vedvick T S, Raschke W C. *Bio/technology*, 1993, 11: 905~910.
- [10] Kobayashi K, Kuwae S, Ohya T. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2000, 89 (5): 479~484.
- [11] US Patent. 1997, 5, 612, 197.
- [12] US Patent. 1997, 5, 656, 729.
- [13] US Patent. 1999, 5, 962, 649.
- [14] Kazuo I, Masaaki H, Takao O. *Analytical Chemistry*, 1997, 69 (11): 1987~1991.
- [15] Ohtani W, Nawa Y, Takeshima K, *et al.* *Analytical Biochemistry*. 1998, 256: 56~62.