

## 从猪血中分离纯化高纯度的猪血红蛋白

周 勃, 边六交

(西北大学生命科学院 国家微检测系统工程技术研究中心, 陕西 西安 710069)

**摘要** :为了从猪血中分离纯化高纯度的猪血红蛋白,建立了通过超滤、DEAE-Sepharose Fast Flow 离子交换色谱和 Sephadex G-75 凝胶排阻色谱三步法制备高纯度猪血红蛋白的方法,并通过十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)、高效凝胶排阻色谱和反相高效液相色谱方法,对纯化后的猪血红蛋白进行了鉴定。经三步分离纯化后,猪血红蛋白的纯度大于 99%,含量为 1.328 g/L。

**关键词** 超滤 ;阴离子交换色谱 ;凝胶排阻色谱 ;猪血红蛋白 ;分离 ;纯化

**中图分类号** Q658 **文献标识码** A **文章编号** :1000-8713 (2008)03-0384-04 **栏目类别** 研究论文

## Separation and purification of porcine hemoglobin from porcine blood

ZHOU Bo, BIAN Liujiao

(College Life Science, Northwest University, National Engineering Research  
Center for Miniaturized Detection System, Xi'an 710069, China)

**Abstract** :In order to perform the isolation and purification of porcine hemoglobin from porcine blood. A three-step method, utilizing ultrafiltration, DEAE-Sepharose Fast Flow anion-exchange chromatography and Sephadex G-75 gel exclusion chromatography in sequence, for the separation and purification of porcine hemoglobin was developed. The obtained hemoglobin was analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), high-performance size-exclusion chromatography and reversed-phase high performance liquid chromatography. Through the three-step purification process, the purity of the obtained hemoglobin was more than 99% with a concentration of 1.328 g/L.

**Key words** :ultrafiltration ; anion-exchange chromatography ; gel exclusion chromatography ; porcine hemoglobin ; separation ; purification

血红蛋白 (hemoglobin, Hb) 是存在于动物红细胞中具有生物传氧功能的重要蛋白质。多年来,以血红蛋白为基础的血液代用品研究一直是国内外医学界研究的重点。该代用品较好地解决了输血血源短缺及血源污染等问题,某些产品目前已经完成或部分完成了临床实验,取得了突破性的进展<sup>[1-3]</sup>。因此对原料血红蛋白的要求也将越来越高,需要探索更为有效的血红蛋白纯化方法。

目前血红蛋白分离纯化的方法很多,如离心透析吸附等。近年来,国内亦见到少量血红蛋白分离纯化方法的报道。樊晶等<sup>[4]</sup>应用萃取-超滤两步法从过期人血中提纯人血红蛋白;李军等<sup>[5]</sup>从新鲜猪血中通过微滤和弱阴离子交换色谱法提纯猪血红蛋

白;李涛等<sup>[6]</sup>使用热敏法纯化人脐带血血红蛋白;路秀玲等<sup>[7]</sup>利用膨胀床吸附纯化牛血红蛋白。研究表明,Hb 类血液替代品的副作用,如肾毒性及某些细胞因子的诱导产生、血栓的形成等<sup>[8]</sup>,皆与 Hb 溶液中所含细胞膜碎片或 Hb 以外的杂蛋白等有关。因此,快速、有效、大量地制备高纯度血红蛋白至关重要。

本实验从新鲜猪血中提取的猪血红蛋白是用于制备一种血液代用品——戊二醛聚合血红蛋白,因而要求猪血红蛋白需具超高纯度。上述已报道的分离工艺要么纯度达不到要求,要么活性损失比较大,很难满足用作血液代用品基质的血红蛋白的要求。为了得到高纯度且活性损失小的猪血红蛋白,经过

比较和筛选多种分离纯化方案,本文建立了一种采用超滤、DEAE-Sephacrose Fast Flow 离子交换色谱和 Sephadex G-75 凝胶排阻色谱三步法从新鲜猪血中分离纯化高纯度猪血红蛋白的工艺方法。

## 1 实验部分

### 1.1 材料

#### 1.1.1 色谱介质和试剂

色谱介质 DEAE-Sephacrose Fast Flow 和 Sephadex G-75 均购自瑞典 Amersham Pharmacia Biotech AB 公司;高效凝胶排阻色谱柱 TSK-GEL G4000SWXL (300 mm × 7.8 mm) 和反相高效液相色谱柱 Shim-pack VP-ODS (150 mm × 4.6 mm) 均购自岛津公司。低相对分子质量标准蛋白质购自上海生工生物工程公司;猪血红蛋白对照品及猪血红蛋白粗品均由陕西北美基因股份有限公司提供;其余试剂均为分析纯。

#### 1.1.2 仪器及设备

美国 Bio-Rad 公司的 Bio-Logic LP 型梯度常压液相色谱仪,日本岛津公司的 LC-10A 型梯度高压液相色谱仪,北京瑞利分析仪器公司的 UV-9100 型紫外-可见分光光度计;Bio-Rad 公司的 Mini. PROTEAN II 型垂直板电泳仪;法国 VILBER LOURMAT 公司的凝胶成像系统。

### 1.2 猪血红蛋白的分离纯化

#### 1.2.1 超滤

将样品用 0.2 μm 滤膜过滤,滤液置于 4 °C 冰箱内保存。

#### 1.2.2 阴离子交换色谱分离

阴离子交换色谱所用固定相为 DEAE-Sephacrose Fast Flow,柱规格为 3.5 cm × 20 cm。洗脱液 A 液为 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.5),B 液为 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 + 0.5 mol/L NaCl (pH 8.5) 梯度洗脱程序为 0 ~ 50 min,100% A 液;50 ~ 240 min,从 100% A 液线性变化到 100% B 液。240 ~ 300 min,100% B 液;洗脱流速为 6.1 mL/min。紫外检测波长为 280 nm。样品为“1.2.1”节中所得滤液。

#### 1.2.3 凝胶排阻色谱分离

凝胶排阻色谱所用的固定相为 Sephadex G-75,柱规格为 3.5 cm × 150 cm,洗脱液为 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.5),流速为 2.4 mL/min,紫外检测波长为 280 nm。样品为阴离子交换色谱分离所得的含猪血红蛋白的收集液。

### 1.3 猪血红蛋白纯度的检测

应用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳

(SDS-PAGE)、高效凝胶排阻色谱和反相高效液相色谱对分离纯化的猪血红蛋白进行纯度测定。

电泳分离胶的浓度 (以体积分数表示) 为 12%,浓缩胶的浓度 (以体积分数表示) 为 5%,以考马斯亮蓝 R-250 染色。

高效凝胶排阻色谱:采用“1.1.1”节所述 TSK-GEL G4000SWXL 凝胶色谱柱,流动相为 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液-0.2 mol/L NaCl (pH 7.5),流速为 1.0 mL/min,检测波长为 280 nm,进样量 20 μL。

反相高效液相色谱:采用“1.1.1”节所述 Shim-pack VP-ODS 反相色谱柱;流动相 A 液为含 0.1% 三氟乙酸的水溶液,B 液为含 0.1% 三氟乙酸的乙腈溶液,梯度洗脱程序为 0 ~ 30 min,100% A 液线性变化到 100% B 液;30 ~ 40 min,100% B 液;流动相流速为 1 mL/min,紫外检测波长为 280 nm,进样量为 100 μL。

### 1.4 猪血红蛋白浓度的测定

采用 HiCn 法<sup>[9]</sup>进行测定。

## 2 结果与讨论

2.1 DEAE-Sephacrose Fast Flow 阴离子交换色谱  
经过超滤的猪血红蛋白在 DEAE-Sephacrose Fast Flow 阴离子交换色谱柱上的分离图谱见图 1。

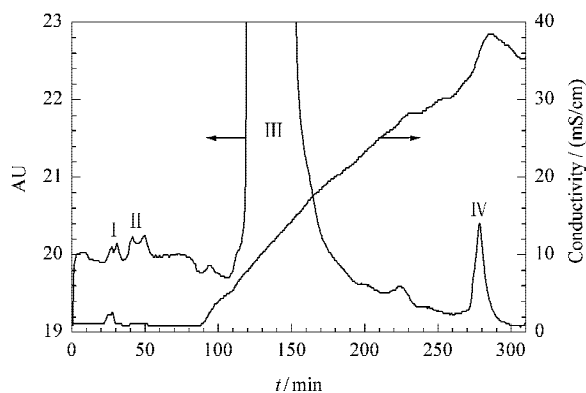


图1 经膜过滤的猪血红蛋白在 DEAE-Sephacrose Fast Flow 阴离子交换色谱柱上的色谱分离图

Fig. 1 Chromatogram of membran filtrated porcine hemoglobin on a DEAE-Sephacrose Fast Flow column

Column size: 3.5 cm × 20 cm. Buffer A: 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.5); buffer B: 50 mmol/L Tris-HCl + 0.5 mol/L NaCl (pH 8.5); elution gradient program: 0 ~ 50 min, 100% buffer A; 50 ~ 240 min, buffer B increased linearly from 0 to 100%; 240 ~ 300 min, 100% buffer B; flow rate: 6.1 mL/min. Sample: about 6 mL membran filtrated porcine hemoglobin. Left Y-axis: UV absorbance at 280 nm; right Y-axis: conductivity of elution solution.

由图1可以看出,猪血红蛋白经 DEAE-Sephacrose Fast Flow 柱分离后得到4个洗脱峰:峰 I (25 ~ 35 min)、峰 II (40 ~ 52 min)、峰 III (120 ~ 180

min)和峰Ⅳ(272~285 min)。收集各洗脱峰,用紫外-可见分光光度计在415 nm下分别对各峰进行检测,其中峰Ⅰ、Ⅱ、Ⅳ组分在415 nm下均没有特征吸收,为杂蛋白组峰。峰Ⅲ为目的蛋白峰。收集图1中的峰Ⅲ流出液,通过SDS-PAGE、高效凝胶排阻色谱和高效反相液相色谱方法,鉴定其纯度分别为99.4%,99.3%,98.5%。为了达到下一步聚合的要求,还需要在Sephadex G-75柱上进行进一步的分离和纯化。

2.2 Sephadex G-75 凝胶排阻柱色谱

收集 DEAE-Sepharose Fast Flow 柱分离得到的含有猪血红蛋白的组分(峰Ⅲ)后,上样至 Sephadex G-75 柱,采用等度洗脱,分离图谱见图2。由图2可见,经 DEAE-Sepharose Fast Flow 柱分离后,含猪血红蛋白的组分(峰Ⅲ)在 Sephadex G-75 凝胶排阻柱上得到一个峰(峰Ⅴ),其保留时间为380~600 min。

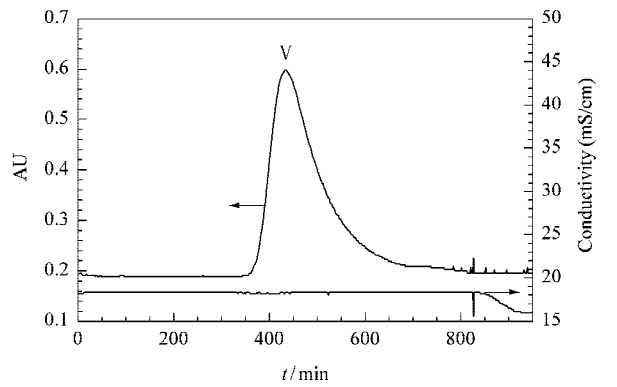


图2 图1中峰Ⅲ组分在Sephadex G-75凝胶色谱柱上的色谱分离图  
Fig. 2 Chromatogram of the fraction of peak Ⅲ in Fig. 1 on a Sephadex G-75 column

Column size :3.5 cm×150 cm ;elution buffer :20 mmol/L phosphate solution (pH 7.5) ;flow rate :2.4 mL/min ;sample : about 65 mL solution fraction collected from DEAE Sepharose Fast Flow column. Left Y-axis :UV absorbance at 280 nm ;right Y-axis :conductivity of elution solution.

2.3 猪血红蛋白的回收率

表1给出了猪血红蛋白粗品在三步分离纯化的各阶段的回收率。

表1 三步分离纯化各阶段的猪血红蛋白的回收率  
Table 1 Porcine hemoglobin recoveries in ultra-filtration, DEAE-Sepharose Fast Flow and Sephadex G-75 column

| Method                   | $\rho$ (Protein) / (g/L) | $m$ (Protein) / mg | Recovery / % |
|--------------------------|--------------------------|--------------------|--------------|
| Ultrafiltration          | 100                      | 600                | 90.0         |
| DEAE-Sepharose Fast Flow | 5.897                    | 553.8              | 83.2         |
| Sephadex G-75            | 1.328                    | 496.2              | 74.5         |

2.4 猪血红蛋白的纯度分析

对图2中峰Ⅴ的流出液进一步进行纯度分析。

2.4.1 12% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳

将经过超滤、DEAE-Sepharose Fast Flow 弱阴离子交换色谱柱和 Sephadex G-75 凝胶色谱柱三步分离纯化所得到的蛋白样品(即图2中的峰Ⅴ)进行 SDS-PAGE 分析,电泳图谱见图3。SDS-PAGE 中 Hb 的迁移仅与其相对分子质量有关,在经过三步纯化后,电泳只显示一条蛋白质条带,说明该血红蛋白的相对分子质量均一,为典型的血红蛋白 SDS-PAGE 图像。经过凝胶扫描分析,该猪血红蛋白的电泳纯度达99.9%。

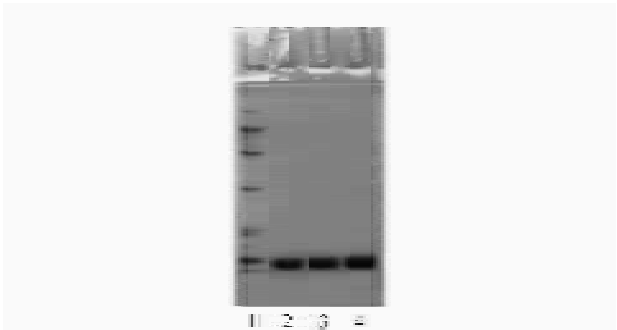


图3 图2中峰Ⅴ的 SDS-PAGE 分析  
Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the fraction of peak V in Fig. 2

1. protein markers ( $M_r$  from top to bottom : 97 400, 66 200, 43 000, 31 000, 20 100, and 14 400, respectively) ; 2, 3, 4. peak V in Fig. 2.

2.4.2 高效凝胶排阻色谱

采用 TSK-GEL G4000SWXL 凝胶柱对所分离提取的猪血红蛋白(即图2中的峰Ⅴ)进行分析,其分析图谱见图4,测定其纯度约为99.9%。

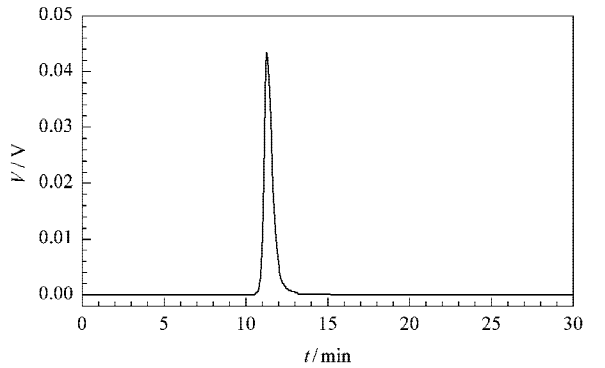


图4 猪血红蛋白在 TSK-GEL G4000SWXL 凝胶柱上的分离图谱

Fig. 4 Chromatogram of the porcine hemoglobin on a TSK-GEL G4000SWXL column

Column size : 300 mm×7.8 mm ; elution buffer : 20 mmol/L phosphate solution (pH 7.5) containing 0.2 mol/L NaCl ; flow rate : 1.0 mL/min ; UV detection at 280 nm. Sample : 20  $\mu$ L solution fraction collected from a Sephadex G-75 column.

### 2.4.3 高效反相液相色谱

采用 VP-ODS 柱对所分离提取的猪血红蛋白(即图 2 中的峰 V)进行分析,其分析图谱见图 5。用 VP-ODS 柱测定其纯度约为 99.1%。

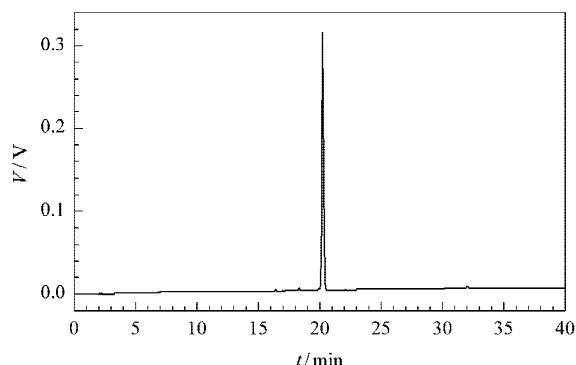


图 5 猪血红蛋白在 VP-ODS 反相色谱柱上的分离图谱  
Fig. 5 Chromatogram of the porcine hemoglobin on a VP-ODS column

Column size : 150 mm  $\times$  4.6 mm ; buffer A :  $\text{H}_2\text{O}$ -0.1% (v/v) trifluoroacetic acid ; buffer B : acetonitrile-0.1% (v/v) trifluoroacetic acid ; elution gradient program : 0 - 30 min, buffer B increased linearly from 0 to 100% ; 30 - 40 min, 100% buffer B ; flow rate : 1 mL/min ; UV detection at 280 nm. Sample : 100  $\mu\text{L}$  solution fraction collected from a Sephadex G-75 column.

由此可见,用上述方法分离纯化所得到的猪血红蛋白的纯度可以满足应用要求。

## 3 结论

在采用超滤、DEAE-Sepharose Fast Flow 弱阴离子交换色谱柱和 Sephadex G-75 凝胶色谱柱对猪血红蛋白进行分离纯化的过程中,膜分离是大量制备高纯度血红蛋白的重要步骤,具有无污染、操作方便、节省原材料、条件温和、蛋白变性少且回收

率高的优点<sup>[10]</sup>。进而采用 DEAE-Sepharose Fast Flow 阴离子交换柱色谱分析,与以往采用的阳离子和强阴离子交换柱相比较,该阴离子交换柱可以更好地保持蛋白质的活性,同时分离速度快、吸附容量大,也便于放大到生产规模。实验结果表明通过上述方法所得到的猪血红蛋白具有很高的纯度,而且工艺简单,处理量大,是一种理想的猪血红蛋白分离和纯化的方法。目前我们正对此工艺进行工业化规模放大研究。

### 参考文献 :

- [1] Yang C M, Li J Z, Ji Y. Scientific basis of transfusion medicine. Beijing : China Science and Technology Press (杨成民,李家增,季阳. 基础输血学. 北京 : 中国科学技术出版社), 2001 : 547
- [2] Chang T M S. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol, 2002, 30 (5/6) : 421
- [3] Chang T M S. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol, 2003, 31 (2) : 151
- [4] Fan J, Chen L W, Wang J C, et al. Tianjin Pharmacy (樊晶, 陈连旺, 王巨存, 等. 天津药学), 2002, 14 (1) : 33
- [5] Li J, Wu W T. Chinese Journal of Nature Medicine (李军, 吴梧桐. 中国天然药物), 2005, 3 (1) : 60
- [6] Li T, Zhang H H, Wang H, et al. Journal of Biomedical Engineering (李涛, 张鸿辉, 王红, 等. 生物医学工程学杂志), 2006, 23 (3) : 640
- [7] Lu X L, Zhao D X, Jin Y T, et al. Journal of Chemical Industry and Engineering (China) (路秀玲, 赵东旭, 金业涛, 等. 化工学报), 2003, 54 (9) : 1 257
- [8] Feola M, Simoni J, Canizaro P C, et al. Surg Gynecol Obstet, 1988, 166 : 211
- [9] Forman C, Drabkin D L, Ehrich W E. Am J Med Sci, 1949, 217 : 710
- [10] Wen T, Liu Y Z, Fang J H, et al. Membrane Science and Technology (温涛, 刘玉振, 方建华, 等. 膜科学与技术), 2000, 20 (3) : 57