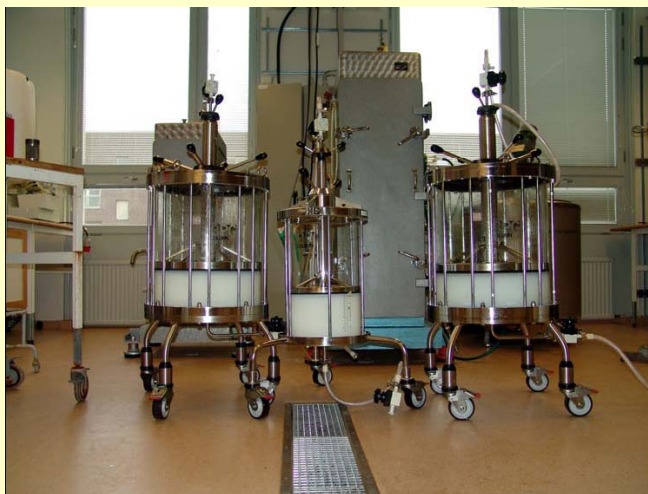


层析工艺在血浆蛋白纯化中的应用

(公司内部交流学习)



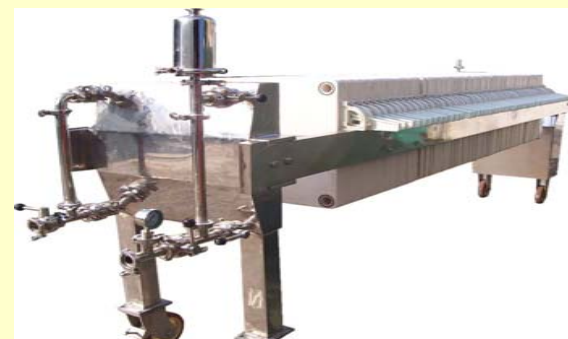
赵彦鼎

西安交大保赛生物技术股份有限公司

2008年4月8日

内容

- 概述
- 层析工艺应用于不同血浆蛋白的纯化
白蛋白
免疫球蛋白
凝血因子
纤维蛋白胶
纤维结合蛋白
凝血酶
抗凝血酶III



概述

血液制品主要指以健康人血液为原料采用生物学工艺或分离纯化技术制备的生物活性制剂。

血液制品的制备方法有Cohn氏低温乙醇沉淀法离心法及压滤法层析法等。其中，应用最多的是40年代发展起来的Cohn法以及改良法。随着生物技术的发展以及市场对产品多元化及产品质量要求的不断提高，其它的分离手段如层析方法，逐渐在纯化工艺中得到了广泛应用。

血液中主要蛋白及临床功能如下：

表1 主要血液制品及其临床应用

Table 1 Present or potentially useful plasma therapeutic products and their major use

	血浆浓度(mg/L)	临床适应症
白蛋白	45000	休克、创伤、外科手术和烧伤病人的血容扩充剂
免疫球蛋白		
IgG	8000~11000	免疫缺陷,易感人群抗感染的被动免疫预防,自体免疫疾病的免疫调节
IgM	1300	败血病
IgA	2700	肠病
凝血和抗凝因子		
PCC		乙型血友病
F VII	0.1	甲型血友病,维生素 K 缺陷,肝病
F IX	3~4	乙型血友病出血的预防和治疗及其他出血疾患
F VII	0.5~2	F VII缺陷(凝血障碍)
Pc	<2	蛋白 C 缺陷(血栓)
F VIIa,活化因子		F VII或 F IX抑制剂引起的血友病
纤维蛋白原	200~500	低或异常和无纤维蛋白原血症出血
F XI	4~6	F XI缺陷(凝血障碍)
F XIII	25	F XIII缺陷(凝血障碍)
vWF		vWF 缺陷(出血)
蛋白酶抑制剂		
AT- III	80~300	肝病、AT- III缺乏引起的出血及血栓
α1-抗胰蛋白酶	1800~2800	肺气肿
C1 酯酶抑制剂	240	遗传性血管神经性水肿
纤维连接蛋白	300	脓血症,呼吸综合症

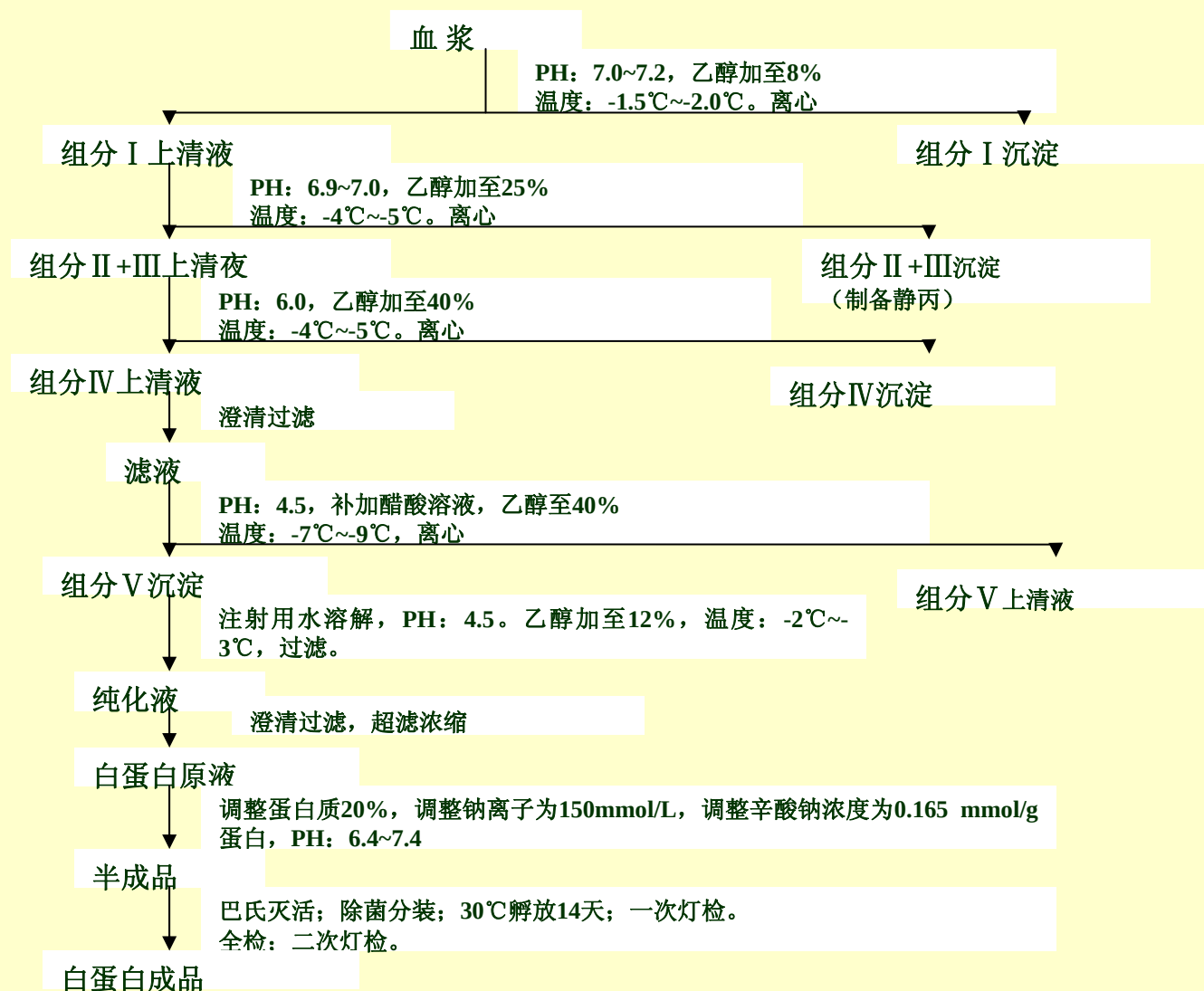
注:PCC:prothrombin complex concentrate,凝血酶原复合物浓缩制品;F VII(Factor VII),因子 VII;F IX,因子 IX;F VII:因子 VII;F XI:因子 XI;F XIII:因子 XIII;vWF: von Willebrand factor,血管性血友病因子;Pc: Protein C,蛋白 C

白蛋白的纯化

血浆白蛋白的分离与应用，始于上世纪40年代，由cohn等人所建立的低温乙醇沉淀法。低温乙醇沉淀法是基于血浆蛋白组分在乙醇溶液中溶解度的差异而实现分离的。该方法作为一项经典分离技术，虽然有较大的局限性，但其程序简单、溶剂价廉，适于工业生产，并能有效保持蛋白的活性，所以曾几经改进，仍被广泛应用。

名称	分子量(KD)	等电点	正常含量(mg/dl)
白蛋白 (Albumin)	66	4.6	3500~5500

白蛋白纯化工艺（国内企业）



白蛋白纯化工艺（马其顿）

人血浆 → SephadexG-25C脱盐 → 优球蛋白沉淀 →

DEAE Sepharose FF → CM Sepharose FF → 55-57℃热处理

→ sephacryl S-200 → 60℃ 10小时 → 白蛋白

用此法生产的白蛋白纯度超过98%，而且没有多聚体，二聚体 $\leq 1.5\%$ ，前激肽释放酶原激活剂（PKA）低于10IU/ml（过高引起降压反应），铝离子含量也少于20 μ g/L，内毒素 < 1 IU/ml，完全符合FDA和EU（欧洲药典）的要求。

注：优球蛋白是含有纤维蛋白原、纤溶酶原及其激活因子的复合物，它在低盐条件或酸性环境中可沉淀。

白蛋白纯化工艺（澳大利亚CSL）

澳大利亚国民血清实验室CSL从1995年六月开始建成投产了世界上最大的层析法白蛋白生产线，该生产线的年处理量为500吨血浆。

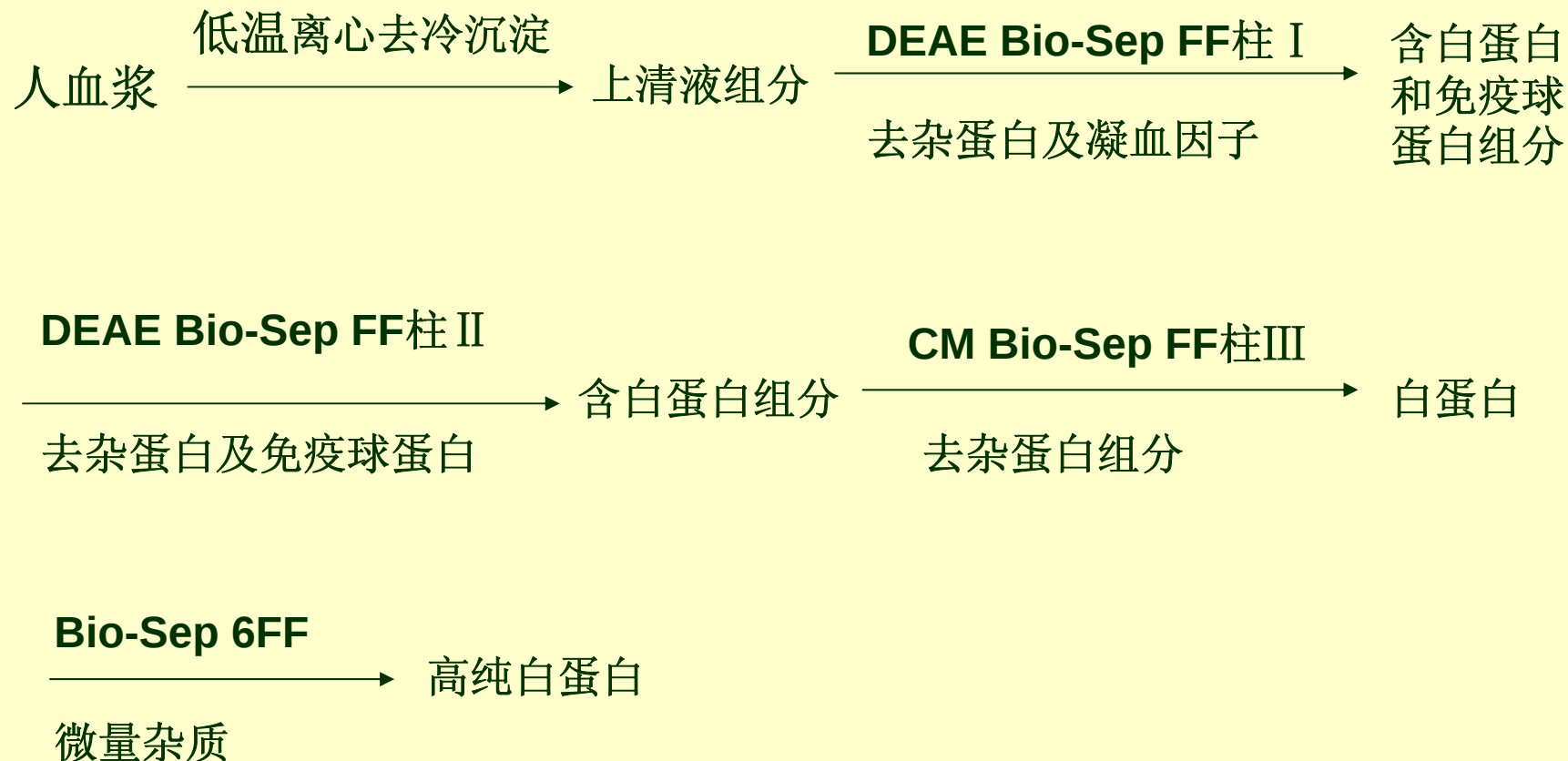
他们采用Cohn 法与层析法结合的工艺将FII+III上清脱盐沉淀优球蛋白后通过DEAE Sepharose FF、CM Sepharose FF 两步离子交换凝胶，一步Sephacryl S-200 High Resolution 凝胶过滤层析得到白蛋白制品。

从CSL的生产部经理Edward M. Smith先生在1999年第一届国际血液制品生物技术会议上发表的论文可知，他们采用这种工艺四年来共投1400 吨血浆，没有一批污染热源和PKA超标，主要得利于层析工艺生产的自动化控制减少了Cohn 法中的手工操作而来而且他们还将层析工艺十分成功地运用于全低温乙醇法中因为热源PKA 以及小白点数超标的不合格制品的回收。

他们的其它经验如下：

- 1 层析凝胶的使用寿命超过5年
- 2 因为层析技术的运用降低了最终产品的生产成本
- 3 建立一个层析工厂的资金花费与低温乙醇法厂相当但运行成本比低温乙醇法厂低
- 4 白蛋白的入库收率为24~26 g/L
- 5 研究表明扩大产生规模可以在不影响现有生产的情况下进行，只要加大层析柱的直径或增加柱子的数目即可，而不必象Cohn 法车间需要对现有生产有太多次的中断才能完成改造，层析技术是一种模块化的应用方法。
- 6 经验证明，增加新的制品生产线只需要在白蛋白工艺主线的分支上加入其它的层析柱即可，CSL的IVIG层析生产线的增加就是一个完美的例子。这就更加坚定了CSL 的管理层在未来使用层析技术生产其它血液制品的信心。在文章中他们还总结了层析法白蛋白工艺的优势高纯度99.5% 低Al³⁺ 浓度10ppm 很低的热源及PKA 值工艺改进的可控性及可预见性是未来技术发展的纽带。

分离程序（作者）



分离色谱图

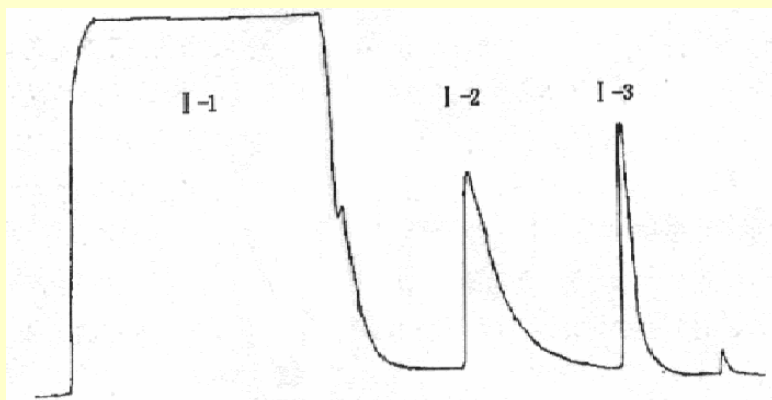


图1. 低温离心后人血浆在DEAE Bio-Sep FF柱 I 上的分离

平衡液: 0.02mol/L 醋酸缓冲液 (pH 6.0)

1. 组分1-1: 含白蛋白和免疫球蛋白等

2. 组分1-2: 杂蛋白 (0.02mol/L 醋酸缓冲液+0.1mol/l NaCl , pH 6.0)

3. 组分1-3: 含一些凝血因子等蛋白
(0.02mol/L 醋酸缓冲液+0.3mol/l

NaCl , pH 6.0)

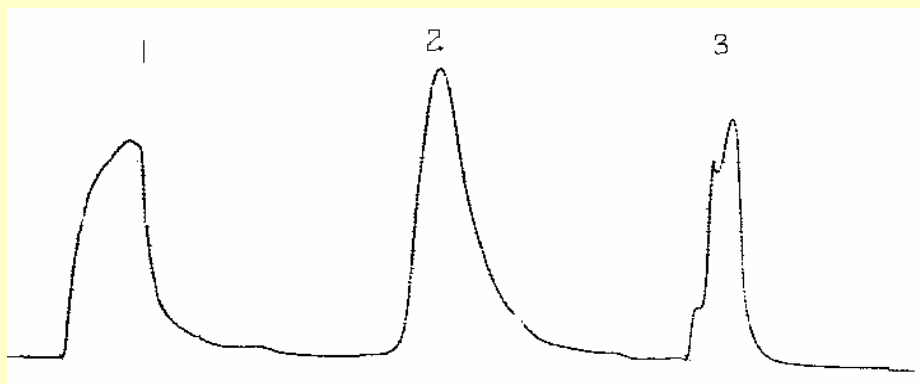


图2. 组分 I -1在DEAE Bio-Sep FF柱 II 上的分离

平衡液: 0.02mol/L 醋酸缓冲液 (pH 5.2)

峰 II-1: 含免疫球蛋白等

峰 II-2: 含白蛋白 (0.025mol/L 醋酸缓冲液 , pH 4.5)

峰 II-3: 杂蛋白 (0.15mol/L醋酸缓冲液, pH 4.0)

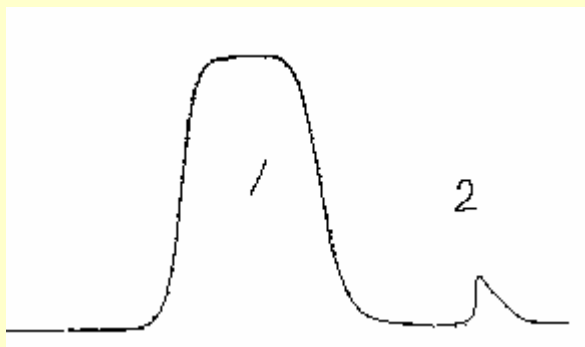


图3. 组分 II-2 在 CM Bio-Sep FF 柱 III 上的分离

平衡液: 0.025mol/L 醋酸缓冲液 pH 4.5

1. 组分 III-1: 白蛋白 (0.11mol/L 醋酸缓冲液, pH 5.5)
2. 组分 III-2: 杂蛋白 (0.4mol/L 醋酸缓冲液, pH 8.0)



图4. 一些样品的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

1. 人血浆, 2. 组分 I-1, 3. 组分 II-1, 4. 组分 II-2,
5. 组分 III-1 (白蛋白), 6. 高纯白蛋白, 7. 商品白蛋白

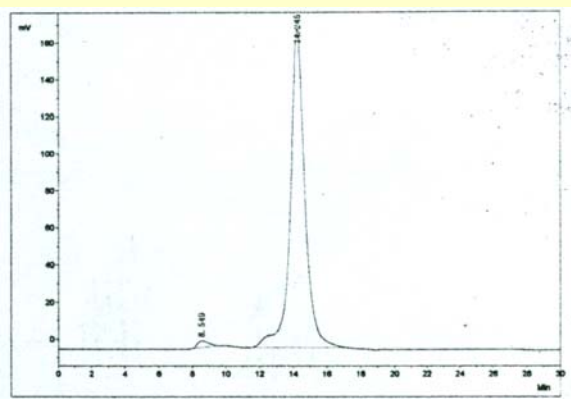


图5. 组分 III-1 中白蛋白的 HPLC 分析



用分析型高效液相层析（HPLC）法测定组分III—1样品中白蛋白的含量（见上图），结果经过三步层析分离所制备的产品，其白蛋白与白蛋白二聚体的含量为98.44%。已达到乃至超过市售商品白蛋白纯度。

对经过四次层析后所得组分IV进行分析该样品的纯度已接近100%。

用考马斯亮兰染料结合法测定蛋白浓度，经计算蛋白的回收率为91.4%。

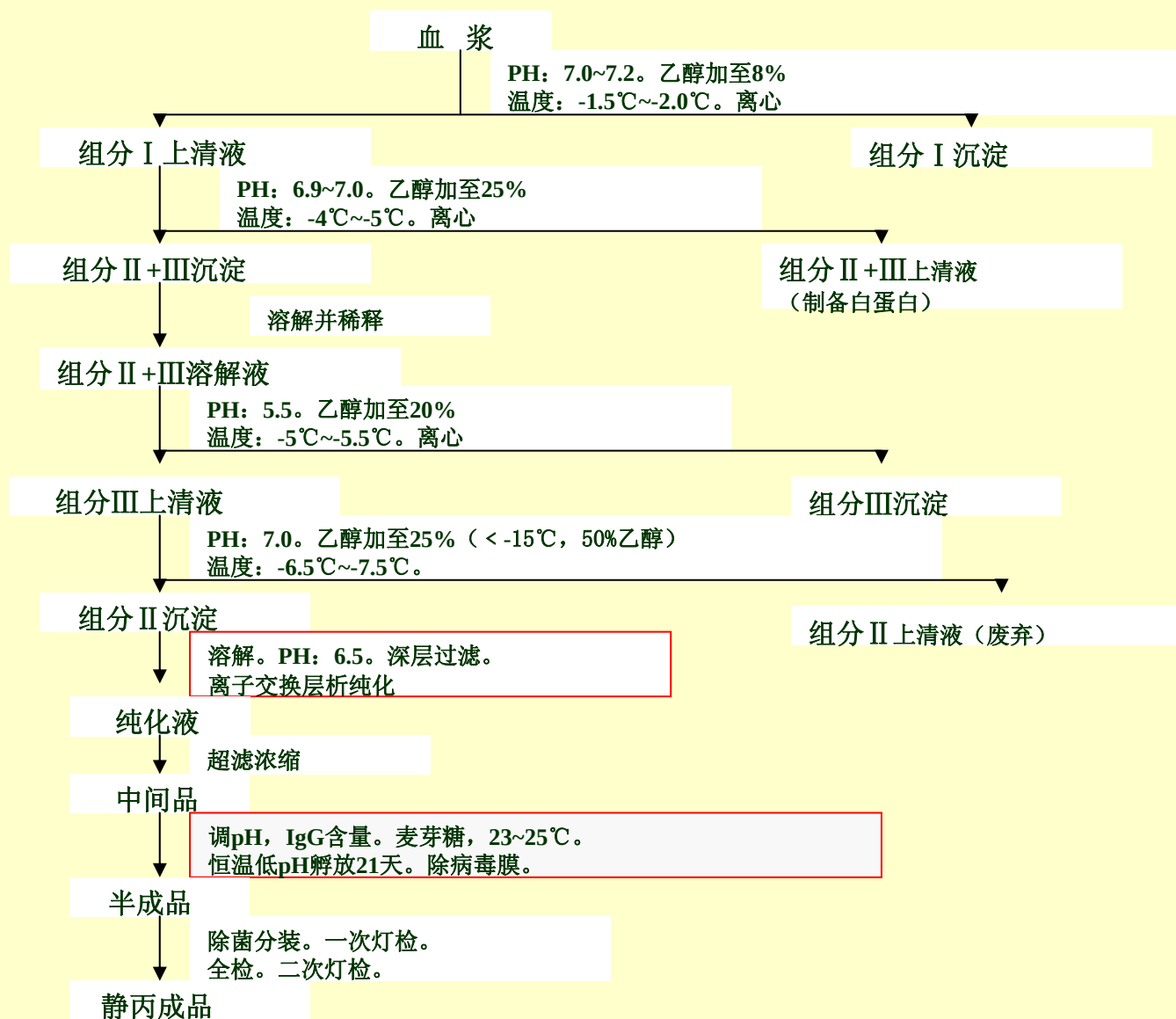
免疫球蛋白的纯化

免疫球蛋白至少有五种（见下图）。这类蛋白构成了机体防御感染的体液免疫系统，和细胞免疫系统一起，对机体抵抗外来病原物的侵袭，发挥极端重要的作用。

正常免疫球蛋白又称丙种球蛋白，也称为多价免疫球蛋白，仅供肌肉注射，若静脉注射会引起不良反应。改进工艺后消除补体活性制备成静脉丙球。

蛋白名称	分子量(KD)	正常含量(mg/dl)	等电点
IgG	150	1250	PH6.85~7.5
IgA	160	210	
IgM	970	150	
IgD	172~200	3	
IgE	188~191	0.03	

IVIG纯化工艺（国内企业）



IVIG纯化工艺（国际上，马其顿）



用此法生产的IgG 成品的纯度大于99%， 而且只有<1% 的多聚体，PKA 低于10IU/ml ， 精氨酸特异性的蛋白酶活性低于1.5IU/L ， 比市场上其它品牌的IgG 质量更优。精氨酸特异性的蛋白酶是造成IVIG 长期放置特别是解冻后IgG水解产生裂解片段影响制品稳定性的主要原因液剂IVIG尤其如此加入层析方法可以很好的解决这个问题同时还能降低IgA 的含量。

IVIG纯化工艺 (Bayer corporation, USA)

拜耳公司是美国IgG 产量第一的血液制品生产企业。他们通过研究开发了一种基于层析技术的IVIG生产工艺，工艺流程如右图：

FII+III 沉淀溶解后，使用辛酸的病毒灭活方法，深层过滤，通过两个串联的离子交换柱吸附杂蛋白：第一个柱子是强阴离子交换的Sephacrose FF 凝胶，用以吸附所有可检测到的白蛋白大多数的IgA 及一些IgM ；第二个柱子是一种弱阴离子交换的Sephacrose FF 凝胶用来吸附剩余的IgM 和其它污染物，过柱后的IgG 溶液经过脱盐浓缩、配制、除菌分装等步骤，得到IVIG制品。



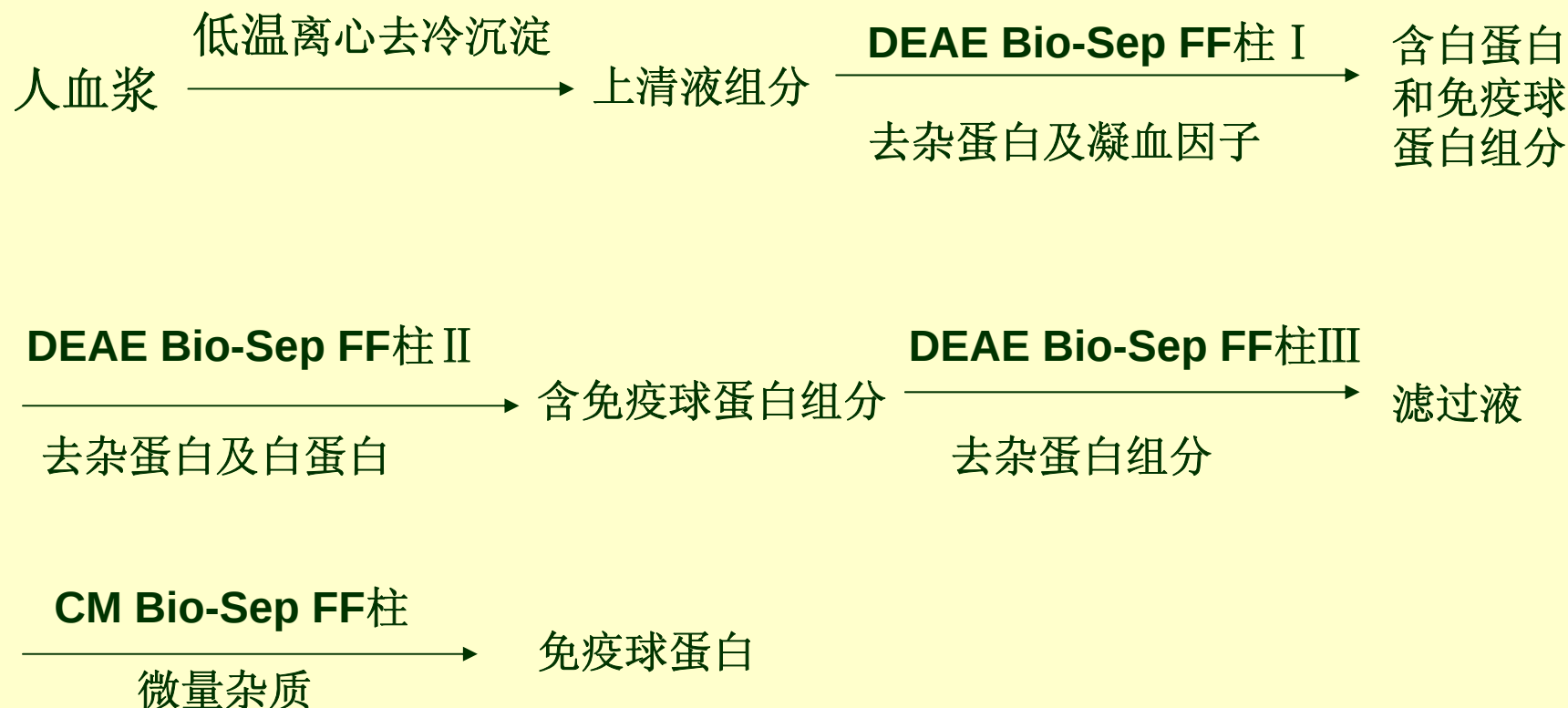
采用以上工艺的好处：

1. 在原来低温乙醇工艺的基础上提高了50%的收率。
2. 可以用Cohn法FII+III 为原料；
3. 可以容易地整合进病毒灭活的方法；
4. 能够放大到每批200Kg

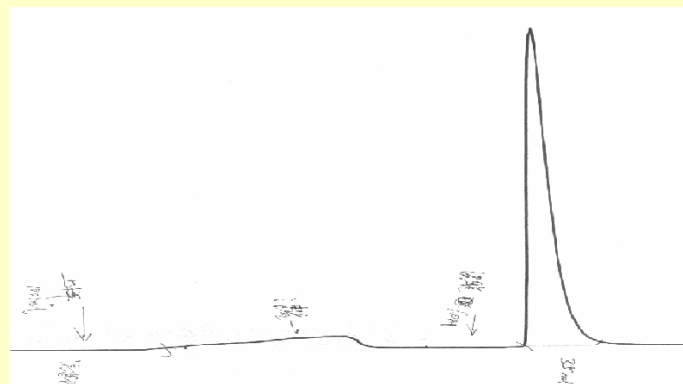
工艺的效率	Cohn 法	层析法
步骤(FII+III 沉淀→分装)	11	8
收率 %	48	75
生产周期 (小时)	100	30

表 3： IVIG 生产工艺效率的比较

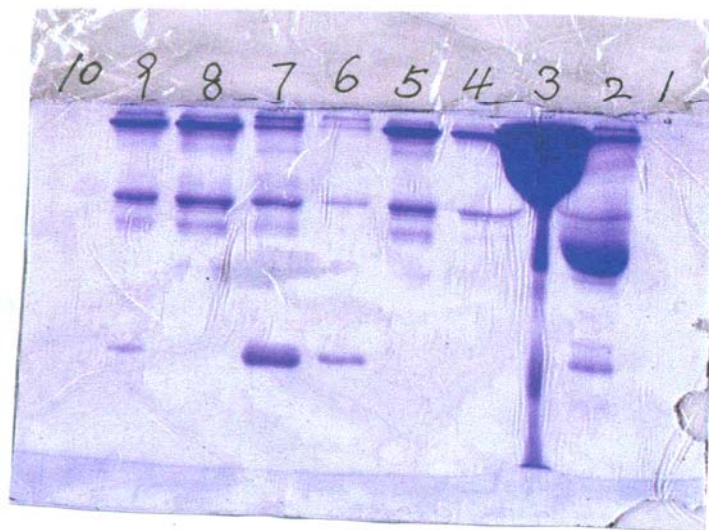
免疫球蛋白纯化工艺（作者，仅供参考！）



分离图谱及结果



1. 空白.
 2. 人血浆
 3. 液质球蛋白 (50ul + 200ul 缓冲液)
 4. DBA 柱洗脱
 5. (浓缩)
 6. DBA. pH 7.0 0.5M 洗脱
 7. (浓缩)
 8. CM 柱球蛋白样
 9. 血液微蛋白时 DBA 洗脱液
 10. 空白
- 11:00 开始 (电压 100V)



凝血因子的纯化

正常血液凝固是一系列血浆凝血因子相继激活，最后形成纤维蛋白凝块的过程。（以瀑布学说为基础的内、外源及共同途径凝血机理）

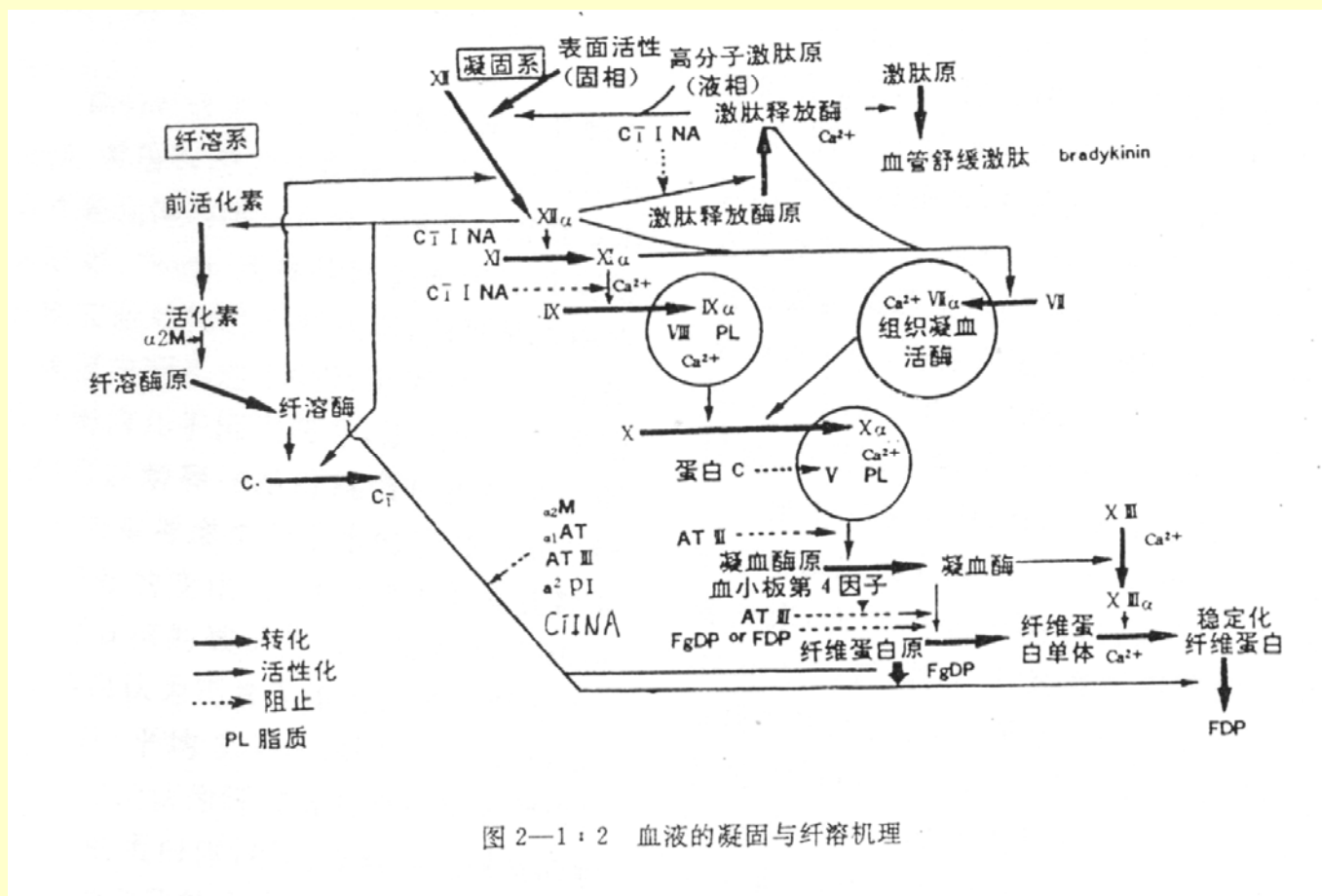
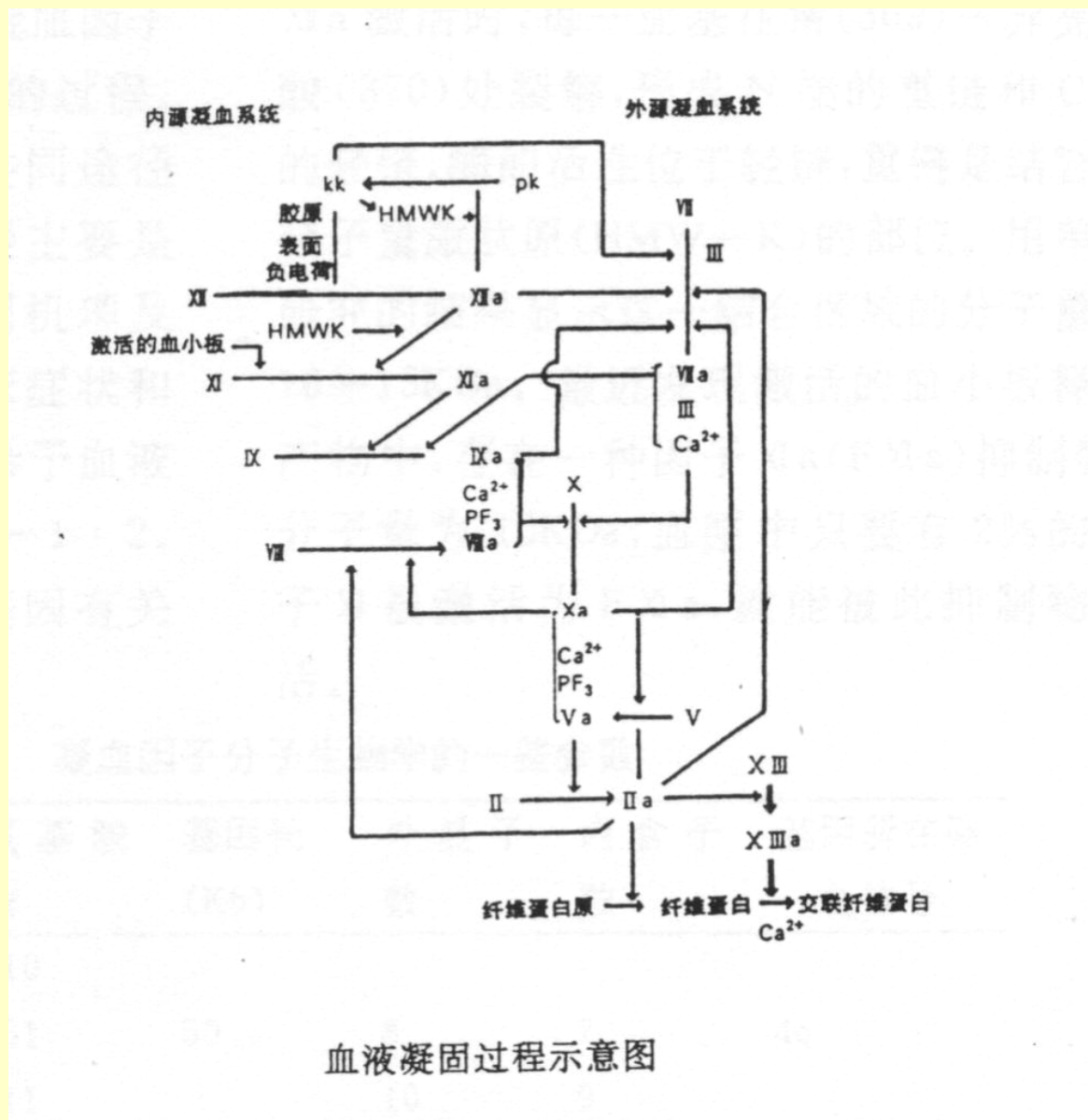


图 2—1：2 血液的凝固与纤溶机理



血液凝固过程示意图

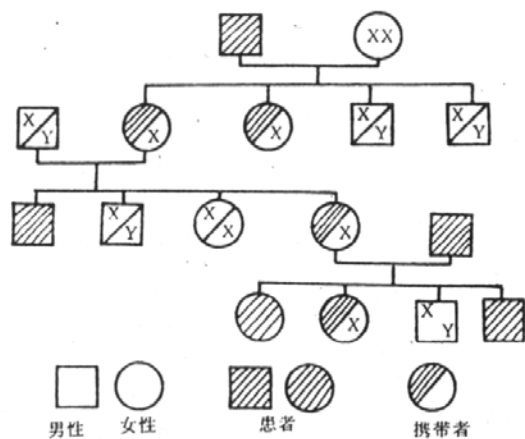
因子Ⅷ复合物

血友病的治疗经历过长期甚至充满磨难的过程。早期通过输新鲜全血或血浆治疗，但因受到输入量的限制疗效并不理想。60年代中期Pool等报道了血浆冷沉淀富含因子Ⅷ活性，揭开了凝血因子替代疗法的新纪元。

1967年，Hershtal首先分离出因子Ⅷ。后经研究，因子Ⅷ分子既有促凝分子Ⅷ：C，可纠正甲型血友病的凝血异常，也有相关抗原ⅧR：Ag，可纠正血管性假性血友病的出血时间。现已知甲型血友病人缺乏的Ⅷ：C与血管性假性血友病（von Willebrand's disease, vWD）病人所缺乏的ⅧR：Ag（vWF）是两种不同的蛋白质，他们共同组成了因子Ⅷ复合物。

凝血因子VIII的纯化

血友病甲或所谓“经典”血友病是一种X染色体连锁的出血性疾病，其特点是凝血因子VIII(FVIII)的缺乏。其分子病理是由于因子VIII基因的缺陷。由于传统的FVIII制剂纯度不够高,且含有大量杂蛋白及存在病毒污染的可能,使许多病人产生病毒感染及引起发热、溶血与免疫异常等副反应。因此,自上世纪80年代开始研究重点是如何提高FVIII的纯度及开发各种灭活病毒的方法。层析法的使用使FVIII的质量得到大大提高。

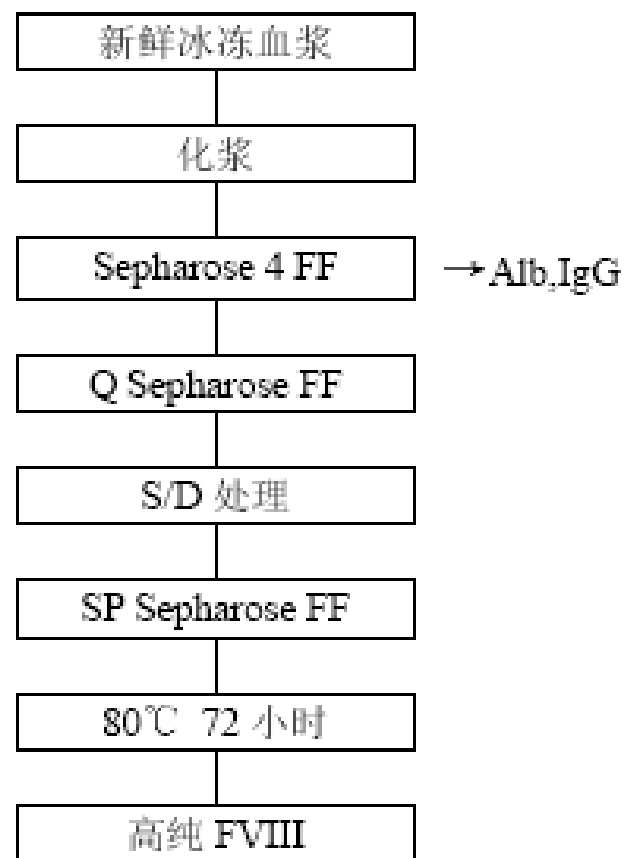


名称	分子量(KD)	等电点	正常含量(mg/dl)
FVIII	约2000		0.1~1

高纯FVIII的纯化（丹麦）

丹麦的Hema Sure Denmark A/S 工厂自1993年以来采用全层析工艺生产高纯FVIII 商品名Nordiate方法如下：

新鲜冰冻血浆融化后通过Sephacrose 4 FF凝胶过滤柱，得到初纯的FVIII，此步骤可以获得60%~70%纯的FVIII，回收比传统的冷沉淀法高40%~50%的收率。通过Q Sepharose FF去除混入的IgG 和Albumin后，接着进行S/D法灭活脂包膜病毒，用SP Sepharose FF去除残留S/D及进一步纯化，经过脱盐、超滤浓缩和冻干后，80℃ 72小时灭活病毒，得到制品。整个工艺可以得到200IU FVIII/L血浆的高收率和比活为300IU FVIII/mg蛋白的高纯FVIII。



高纯FVIII的纯化（瑞典）

Purification of Factor VIII from human plasma (Kabi AB, Stockholm, Sweden)

Human plasma (4x1000 kg, frozen)

↓ 4000 l

Cold precipitate (0° C)

↓

Repeated precipitations (+10° C)

↓

Virus inactivation (detergent)

↓ 100 l

MAb-Sepharose® Fast Flow (3 l stainless steel column)

↓

Anionexchange chromatography (0.5 l -"-)

↓ 2 l

Formulation (2 l; 1000 doses of 2 ml)

vWF的纯化（法国里尔 T.Burnouf）

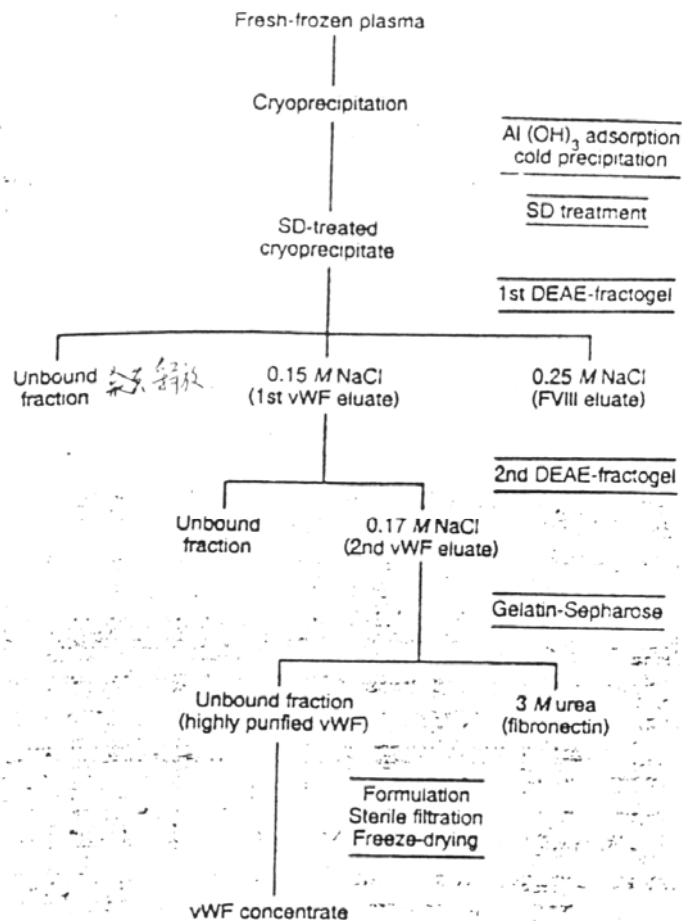


Fig. 1. Purification process of vWF.

Table 1. Characteristics of the vWF processing

Processing steps	vWF:Ag content U/mg	vWF specific activity U CBA/mg	vWF recovery* %	Purification factor ^b
Initial				
processing	1.8	1.2	86	120
SD traitement	1.8	1.2	83	120
1st DEAE-fractogel	65	65	37	4,500
2nd DEAE-fractogel	182	300	41	13,000
Gelatin-Sepharose	205	345	40	14,000

From cryoprecipitate (based on CBA).
Refers to vWF:Ag from starting plasma.

凝血酶原复合物的纯化

人凝血酶原复合物(Prothrombin Complex Concentrate , PCC) 是一种供静脉输注, 促进血液凝固的止血制剂, 含有凝血因子II(凝血酶原)、凝血因子VII (稳定因子)、凝血因子IX(抗乙型血友病因子) 和凝血因子X(自身凝血酶III) 。这是一组依赖维生素K 在肝脏合成的凝血因子, 因而也称为“维生素K依赖因子”。PCC 属糖蛋白, 分子中均含有特殊的氨基酸残基—— γ 羧基谷氨酸(Gla) , Gla 是可以与钙离子结合的氨基酸, 它的存在使依赖维生素K凝血因子具有与金属离子结合的性质。依赖维生素K凝血因子与钙离子结合后发生构象改变, 从而显露出与磷脂膜结合的特征, 并进而参与血液凝固过程。依赖维生素K 凝血因子都是丝氨酸蛋白酶(原) , 它们的催化区在结构和氨基酸顺序上与糜蛋白和胰蛋白酶同源。

PCC（凝血酶原复合物）主要用于治疗乙型血友病、肝脏疾病等。在国内，由于肝炎发病率很高，因而大量应用在临床肝脏出血的病人，随着医生的认同，PCC的使用量正在逐年增加。在高纯FIX的工艺流程中去除亲和层析步骤，即是很好的PCC生产工艺，生产中的关键是防止凝血酶的激活。

表1 PCC中各组因子性质

名称	分子量(kD)	糖含量(%)	氨基酸残基数	Gla 数量	等电点(PI)	生物半寿期(h)	正常含量(mg/L)
FII	72	8	579	10	4.1	72	150~200
FVII	50	13	406	11	4.0~4.6	4~6	0.5~2
FIX	56	17	415	12	4.0~4.6	24~56	3~5
FX	59	10	448	11	4.1~4.6	48~72	6~8

PCC分离工艺

最早pcc的纯化多用无机盐吸附，如上世纪五六十年代采用磷酸钙、氢氧化铝吸附。自七十年代开始采用层析技术，如DEAE-cellulose、DEAE-Sephadex A50等阴离子交换剂的使用，可使PCC中FIX含量达到23~29IU/ml，特异活性一般在0.7~1.0 IU/mg，相当于从血浆中纯化了50~100倍。该类工艺较多，现仅以美国红十字血液研究实验室Wickerhauser M. 1972年发表的工艺为例说明。

Vox Sang. 22: 137-160 (1972)

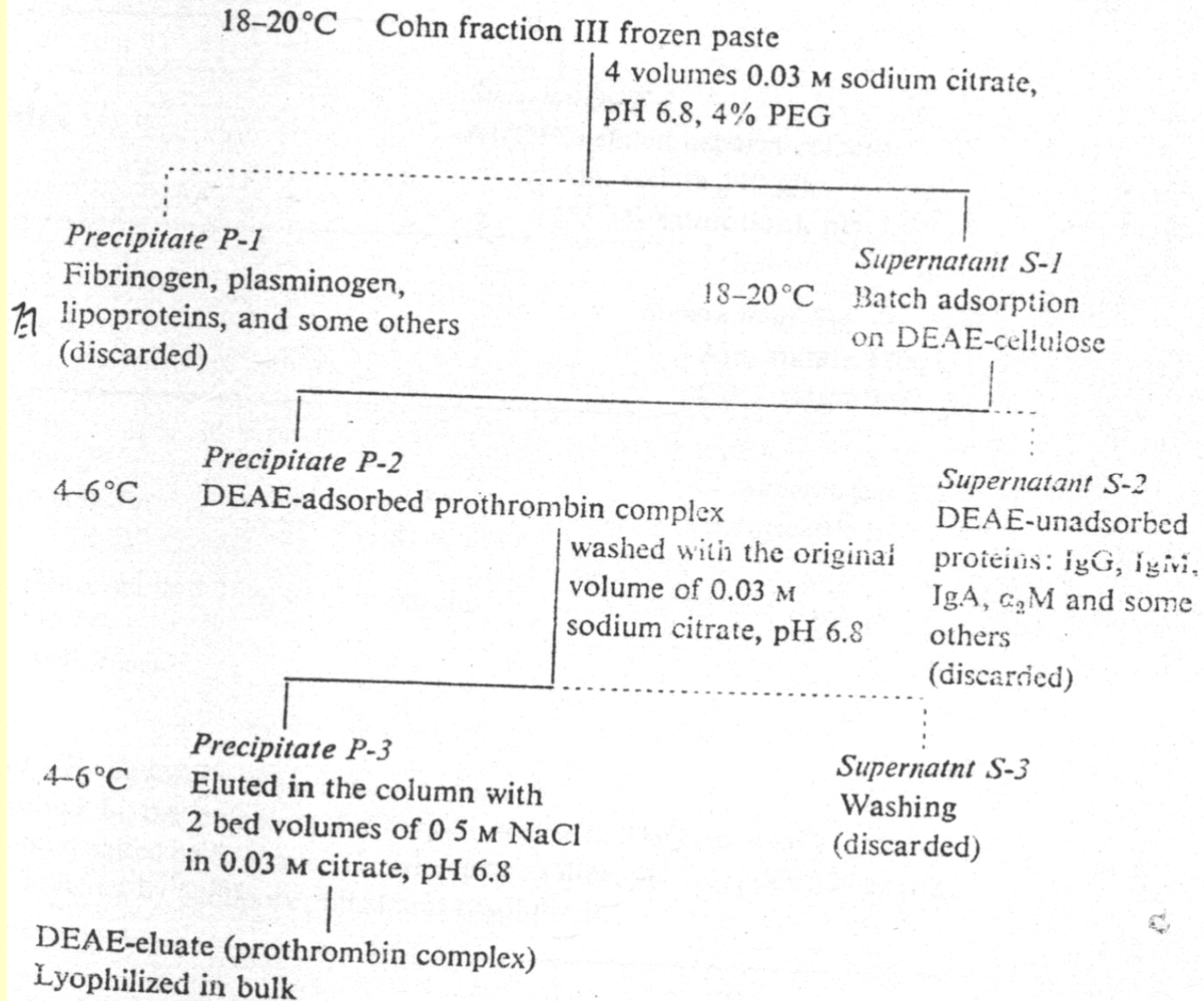
Development of Large-Scale Fractionation Methods

II. Isolation of a Factor IX Concentrate (Prothrombin Complex) for Clinical Use¹

M. WICKERHAUSER and J. T. SGOURIS

American Red Cross Blood Research Laboratory, Bethesda, Md., and the Michigan Department of Public Health, Lansing, Mich.

I. DEAE-eluate

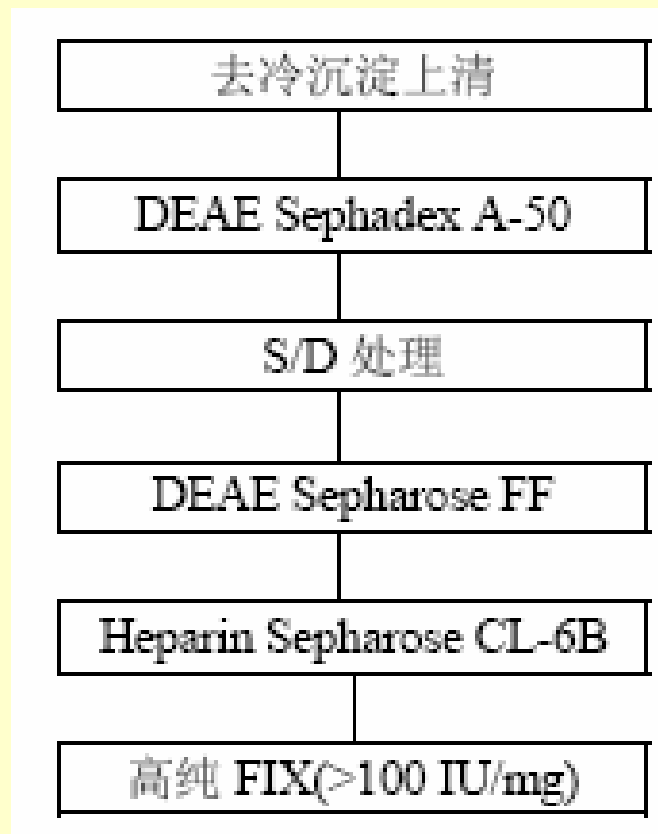


高纯FIX分离工艺(法国)

缺乏FIX 的乙型血友病病人需长期输注凝血酶原复合物作治疗，但是该复合物中的一些致血栓性物质可能引起广泛性静脉血栓，因此，不含其他凝血因子如FII、FVII和FX的高纯度FIX成品需求尤为迫切。层析技术使生产高纯度FIX的浓缩产品变为可行。

1989年，法国里尔输血中心（CRTS, Lille France）的Burnouf及Michalsk等介绍了一种已在大规模生产中应用的包括病毒灭活工艺在内的三步层析法（如右图），平均可从1 L血浆中提得 320 ± 28 IU的FIX，平均特异活性达 119 ± 10 IU/mg，FIX：Ag约占蛋白总量的75%，提纯度相当于血浆的7000倍，并在法国获准生产。

层析工艺工艺的加入，一方面缩短了生产过程，提高了产品的纯度、活性；另一方面和灭活工艺结合，有效去除了病毒。



高纯FIX分离工艺(澳大利亚CSL公司)

J. Biol. Chem. (2000) 275, 129–136

Available online at <http://www.idealibrary.com> on IDEAL®

Inactivation and Clearance of Viruses During the Manufacture of High Purity Factor IX



Anna Johnston¹, Andrew MacGregor¹, Steven Borovec¹, Meghan Hattarki¹, Keith Stuckly¹,
David Anderson², Nell H. Goss¹, Adrian Oates¹ and Eric Uren¹

CSL Limited, Bioplasma Division, Research & Development 189–209 Camp Road, Broadmeadows, 3047, Victoria, Australia. ²Macfarlane Burnet Centre for Medical Research, Melbourne, Australia.

Abstract. Haemophilia is a bleeding disorder characterised by a deficiency in Factor IX. Replacement therapy in the form of a Factor IX concentrate is a widely accepted practice. In this paper we describe a double virus inactivated chromatographic process for producing a high purity Factor IX product, MonoFIX[®]-VF. The process involves separation of the prothrombin complex by cryoprecipitation, fraction I precipitation and DEAE-cellulose adsorption, further ion-exchange chromatography of crude Factor IX, followed by solvent/detergent treatment. Heparin affinity chromatography is then used to further purify Factor IX. Final nanofiltration is sequential through 35 nm then 15 nm membrane filters. The principal virus inactivation/removal steps are solvent/detergent treatment and nanofiltration and the partitioning of relevant and model viruses provides further reduction in virus load through the production process.^{3,6}

Solvent/detergent treatment was shown to achieve log reduction factors of 4.5 for HIV-1, 5.1 for Sindbis virus, 6.1 for vesicular stomatitis virus (VSV), 5.1 for bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and 5.3 for pseudorabies virus (PRV). BVDV is a model for hepatitis C virus (HCV), and pseudorabies virus (PRV), like hepatitis B virus (HBV) is an enveloped DNA virus. Using scaled down models of the production process, we have also demonstrated the neutralization/partitioning of at least 6 logs of hepatitis A virus (HAV) during cryoprecipitation, Fraction I precipitation, and the DEAE adsorption and elution step, and a further 1.6 log reduction in HAV load as a result of heparin affinity chromatography. The log reduction factors for HAV as a result of the second ion-exchange chromatography step and as a result of enhanced neutralisation associated with solvent/detergent treatment were not significant.

Nanofiltration was shown to contribute a further log reduction factor of 6.7 for HAV and 5.8 for BVDV indicating that log reduction factors of this order would be obtained with other viruses of a similar or larger size, such as HIV, HBV and HCV.

Overall, these studies indicate that MonoFIX[®]-VF is a product with an extremely high level of viral safety.

© 2000 The International Association for Biologicals

Key words: Virus inactivation, Factor IX, virus partitioning, nanofiltration

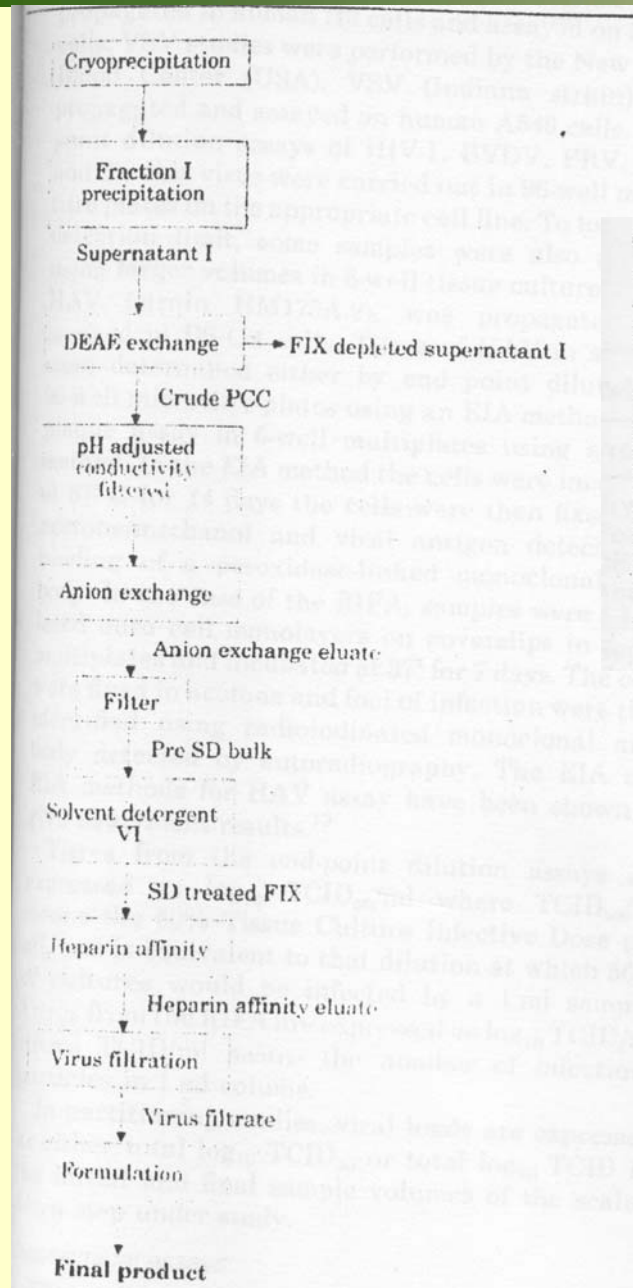


Table 3. Specific activity of Factor IX across the MonoFIX[®]-VF process. (Mean $\pm$ SD, $n=2$)

Sample	Small scale Specific activity (IU/mg)*	Production scale
Cryosupernatant	<0.1	<0.1
Supernatant I	<0.1	<0.1
DEAE eluate	nd	3.3 $\pm$ 0.9
Anion exchange eluate	2.9 $\pm$ 1.3	4.5 $\pm$ 0.8
Solvent/detergent treated	3.4 $\pm$ 0.5	3.4 $\pm$ 0.4
Heparin affinity eluate	48 $\pm$ 20	78 $\pm$ 11
Virus filtrate	50 $\pm$ 13	52 $\pm$ 4

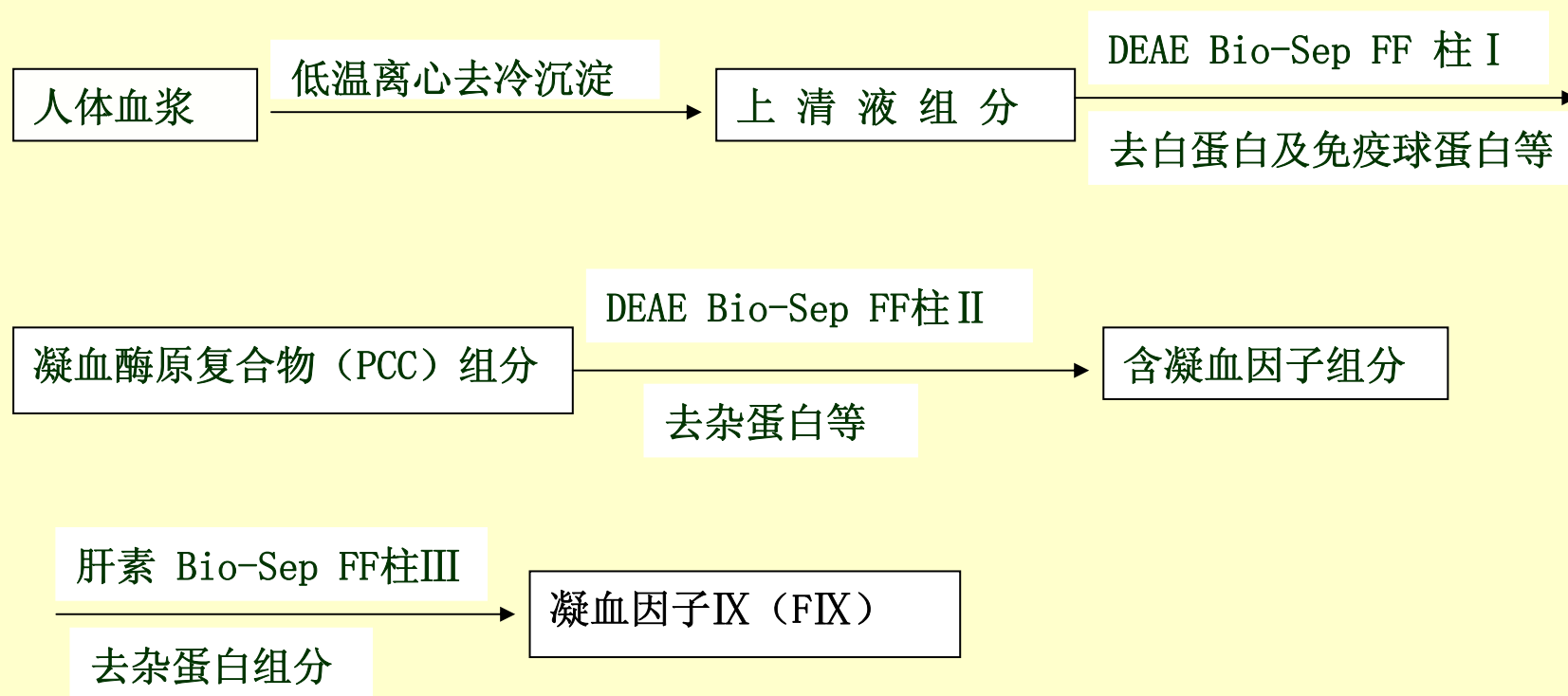
*Activity (IU/ml)/protein concentration (mg/ml) nd: not determined.

实际生产流程如左图，FIX从粗PCC中纯化而来。纳米膜过滤实际包含两个过程，分别是35nm和15nm过滤。

产品在保证比活的情况下总回收率可达80~90%。

该文章结果表明，强阴离子交换剂对病毒无吸附，而弱阴离子交换剂DEAE有21log的保留，说明病毒的色谱保留很复杂，不仅仅受电荷、等电点及颗粒大小的影响。

高纯FIX分离工艺(作者)



纯化结果

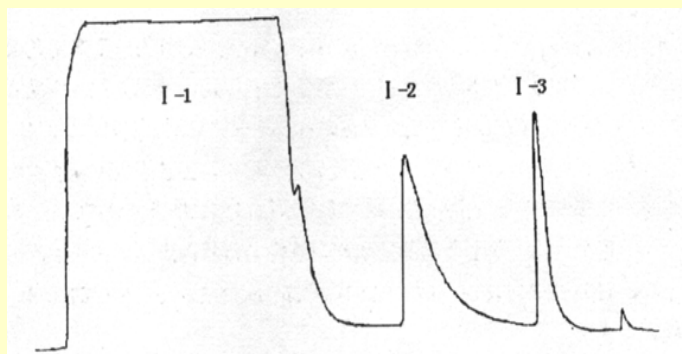


图1. 第1步层析：低温离心后人血浆在DEAE Bio-Sep FF柱 I 上的分离

组分1-1：含白蛋白和免疫球蛋白等；组分1-2：杂蛋白；组分1-3：凝血酶原复合物（PCC）

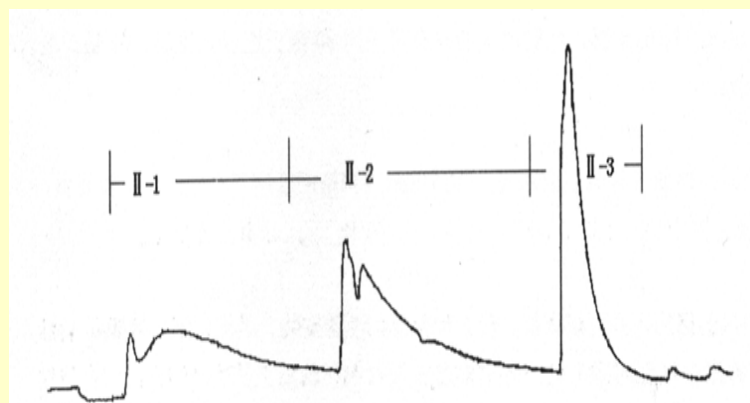


图2. 第2步层析：组分 I-3 在 DEAE Bio-Sep FF 柱 II 上的分离

组分 II-1，杂蛋白；组分 II-2，杂蛋白；组分 II-3，含凝血因子组分（主要含凝血因子 II、IX、X 等）；

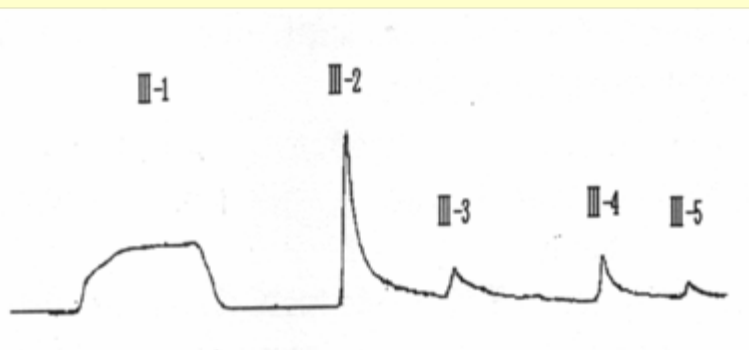


图3. 第3步层析： 组分 I-2在肝素 Bio-Sep FF柱III上的分离
组分 I-1，杂蛋白（含 II 因子）；组分 I-2，杂蛋白（含 X 因子）；组分 I-3、I-4、I-5均含有凝血因子IX

	Specific activity (IU/mg)	Purification multiple
Plasm	0.02	1
Fraction I -3	1.26	48
Fraction II -3	2.63	101
Fraction III-3	10.3	398
Fraction III-4	99.4	3823
Fraction III-5	19.8	761
	0	

结论：

经过一步阴离子交换层析，所得含凝血因子组分的凝血酶原复合物(简称PCC)，其FIX的比活（1.26 IU/mg）已经超过我国2005版药典中对凝血酶原复合物（PCC）中IX因子含量不低于0.3 IU/mg蛋白的要求，经过三步层析分离，所得到目标产品FIX组分的比活值（99.4 IU/mg），已超过欧洲药典中关于高纯度FIX制剂比活值不低于50 IU/mg的标准。从目标纯度的电泳分析结果中，也同样说明本实验已达到预期的纯化目的。

从层析过程的洗脱曲线和相应洗脱组分的定性检测结果看出，在第一、二步层析中，目标蛋白FIX都分别地集中在组分 I-3和 II-3中，没有发现流失现象，而且组分谱图显示出有较高的分离度。这无疑为进一步的分离纯化提供了甚为有利的条件。在弱阴离子交换层析中，如图1，2所示那样，人血浆中凝血系统的诸蛋白都基本上在最后被洗脱出，所以利用此方法从血浆中分离含有凝血因子 II、VII、IX、X 的PCC制剂，是完全可行的。从第三步肝素亲和层析的结果来看，虽然由于一些组分的含量低而谱图峰形较小，但仍然是清晰可辨，从制备技术上仍可有效的分段收集其洗脱组分。本实验在分离纯化FIX的同时，也对其他凝血因子进行了跟踪检测，发现这些蛋白在层析过程中均有不同程度的富集，例如凝血因子 II 和 X 分别在组分 III-1和 III-2中的比活都很高，显然此类结果也为其它凝血因子的分离纯化提供了参考依据。

FIX在血浆中属于微量组分，欲获得高纯度的产品，无疑是很困难的。从现有文献的报道情况来看，无论采用那种纯化制备方法（包括不同分离模式组合的全层析方法），目标蛋白的回收率均不太高，本次实验也同样存在此类问题。另外，本实验主要侧重于分离方法的建立与考察，在分离过程中并未加入病毒灭活步骤。所以在分离过程中如何提高目标蛋白的回收率，如何有效地实施病毒灭活，尚待进一步研究。

纤维蛋白胶

纤维蛋白胶（Fibrin Glue）简称FG或（Fibrin Sealant）简称FS，是以纤维蛋白原及凝血酶为主要原料的医用粘合胶。现在广泛应用于外科各领域，如止血、实质性脏器的粘合、吻合口瘘的防治等均显示其良好的性能。主要成分为纤维蛋白原、凝血酶、Ca²⁺，此外还有因子XIII、纤维连接蛋白及少量II、V、IX等其它凝血因子。

表1 市售 FS 组成成分

组成	浓度	来源
纤维蛋白(可凝固蛋白)	(80~120) g/L	人血浆
F X III(活性)	(10~30) U/ ml	人血浆或人胎盘
纤维结合蛋白(抗原量)	(5~20) g/L	人血浆
凝血酶(活性)	(300~600) NIH-U/ ml	人血浆或牛血浆
抑肽酶	3000kIU/ ml	牛肺
氯化钙	(40~60) mmol/L	无机物

表2 FS组成的作用机理

组成	作用机理
纤维蛋白原	血液凝固中的主要结构蛋白,可以转化为纤维蛋白,形成不溶性凝块;纤维蛋白通过多种作用方式与生物组织相结合,把凝块固定于胶原上;纤维蛋白降解产物通过刺激作用促进本身的消除,有利于新血管的形成
F XIII	转化为 XIIIa,催化纤维蛋白交联;保护凝块不被纤溶酶过早地降解;促进成纤维细胞增生
纤维结合蛋白 (粘性糖蛋白)	促进纤维蛋白交联;促进细胞粘着;可能有助于细胞迁移至创口部位
凝血酶	促进纤维蛋白原转化为纤维蛋白,调控纤维蛋白的聚合速度;促进成纤维细胞和其它内皮细胞的分裂,有助于创口的愈合
抑肽酶	抑制或减缓纤溶酶对凝块的降解
氯化钙	催化纤维蛋白原转化为纤维蛋白;催化纤维蛋白交联;催化 F XIII 转化为 XIIIa

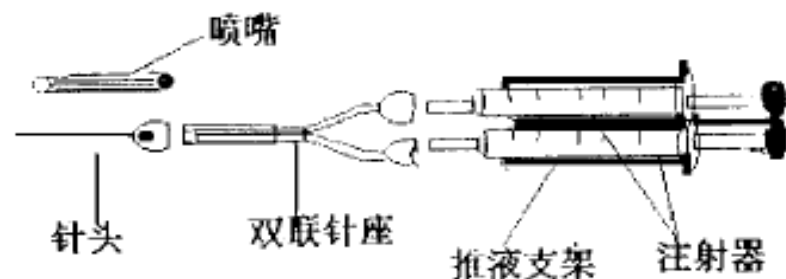


图3 双联注射器



名称	分子量(KD)	等电点	正常含量(mg/dl)	备注
纤维蛋白原 (Fg)	330~340	5.5	200~450	文献中数据出入较大,仅供参考。
人凝血酶原 (F II)	72	4.2	5~10	
牛凝血酶	70~72	5.0~5.5		

纤维蛋白原的纯化

纤维蛋白原(Fib) 是血浆中含量最高的一种凝血蛋白, 由肝细胞和巨核细胞合成, 是急性蛋白之一, 同时也是血浆中最早分离出来的一种可溶性糖蛋白。

商品Biocol制剂的制备工艺如下:

全血浆于37℃融化, 以预冷的10%乙醇作6小时以上沉淀处理, 离心分得Fg浓缩物。该浓缩物再溶于中性pH Tris/枸橼酸盐/赖氨酸缓冲液, 并用有机溶剂/表面活性剂(S/D)作病毒灭活处理, 然后在4℃再用预冷乙醇作10~12小时的第二次10%乙醇沉淀。这次处理可提高Fg纯度及除去S/D。产生的沉淀再溶于中性pH Tris/NaCL缓冲液中, 并用超滤浓缩法调节蛋白浓度, 然后除菌过滤、分装冻干。

凝血酶的纯化

凝血酶(Thombin)是在血液凝固系统中起重要作用的丝氨酸蛋白水解酶，是凝血酶原经凝血酶原激活物激活而成，具有较高的专一性，是近年来国内开发的一种新型速效局部止血药。

制备凝血酶的原料多为牛、猪和人的血浆。另外，还有从鸵鸟和鲑鱼的血液分离凝血酶的报道。凝血酶分离纯化过程包括血浆的预处理、凝血酶原的提取、凝血酶原的激活和粗凝血酶的获得及凝血酶的纯化。

目前凝血酶原的制备方法主要有柠檬酸钡吸附法、氢氧化镁吸附法和等电点沉淀法3种。凝血酶原激活后得到的粗酶液中含有其他的一些凝血因子，因此需要进一步的纯化。目前纯化凝血酶主要采用离子交换层析，凝胶层析和亲和层析。

离子交换:

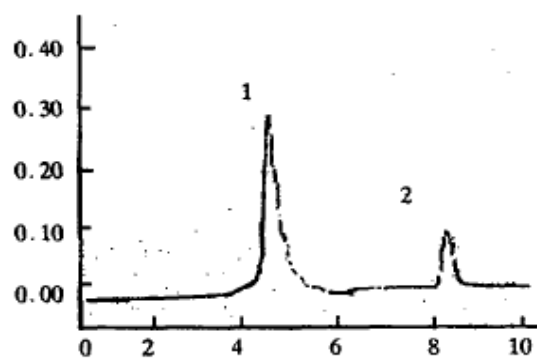
前面提到凝血酶的等电点在5.0~5.5。在 $\text{pH} > 5.5$ 的条件下,凝血酶分子带负电,因此可用阴离子交换剂对其进行纯化,但文献多见使用葡聚糖及纤维素介质,如下:

辛春艳等利用DEAE-52离子交换层析纯化、等电点沉淀法制备的粗凝血酶,所得凝血酶的比活为64.31NIHU / mg, 得率为2058NIHU / L。许长法等利用DEAE-纤维素柱和磷酸纤维素柱分离纯化粗凝血酶液。粗酶液先用DEAE-纤维素柱分离,再用磷酸纤维素柱纯化,再经SephadexG-100凝胶过滤,得到凝血酶电泳纯,比活力为1610NIHU / mg, 酶活力回收率为48.1%。肖丽霞等用DEAE纤维素(DE32)柱层析和SephadexG-100分子筛层析从猪血浆中纯化得到猪凝血酶,酶比活力为2000U / mg, 纯化倍数为100, 酶活力回收为56%。

亲和层析:

凝血酶与低分子量肝素之间有特异性的作用。利用它们之间的特异性亲和作用,可以将低分子量肝素固定载体上,对凝血酶进行亲和层析纯化。据现有的报道,该法用于凝血酶分离纯化,使用的亲和载体有壳聚糖、琼脂糖4B、Sephadex CL-6B;

王海亭等利用Sephacrose CL-6B作为亲和载体，溴化氰活化后结肝素制得亲和层析介质，对猪凝血酶粗酶进行纯化。使其比活提高了32.5倍，回收率为50.6%（色谱图如下）。



1. 洗脱液流穿峰 2. 凝血酶
图5 凝血酶亲和层析纯化曲线

肖丽霞等作了壳聚糖和琼脂糖4B两种不同的亲和吸附剂对猪凝血酶分离纯化效果的比较（结果如右）。

表1 猪凝血酶亲和层析结果
Table 1 Affinity chromatography of thrombin

步骤	总蛋白/ mg	总活性/ U	比活/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	收率/ %	提纯 倍数
上样液	1.00	3.8	492.0	128.0	100.0
亲和层析 1	0.27	302.1	1126.4	61.4	8.8
上样液	7.40	1000.0	135.1	100.0	1.0
亲和层析 2	0.51	788.0	1553.7	78.8	11.5

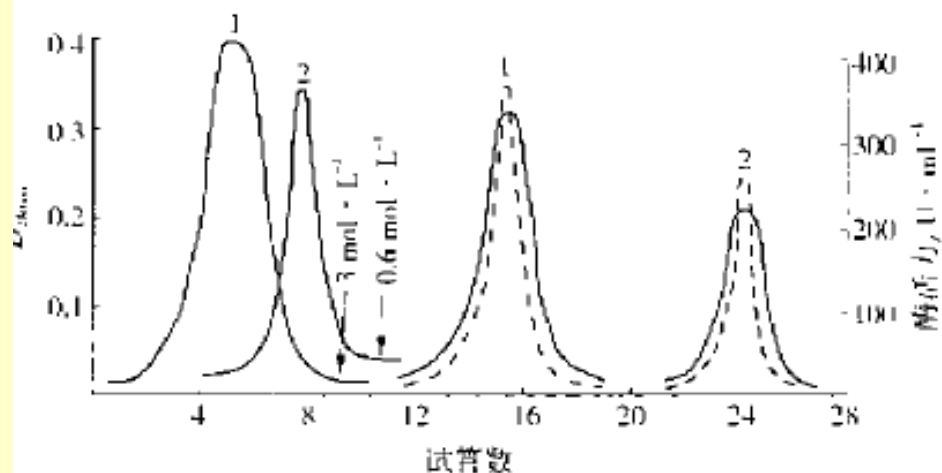


图1 亲和层析洗脱图谱(流速 $12 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1}$)

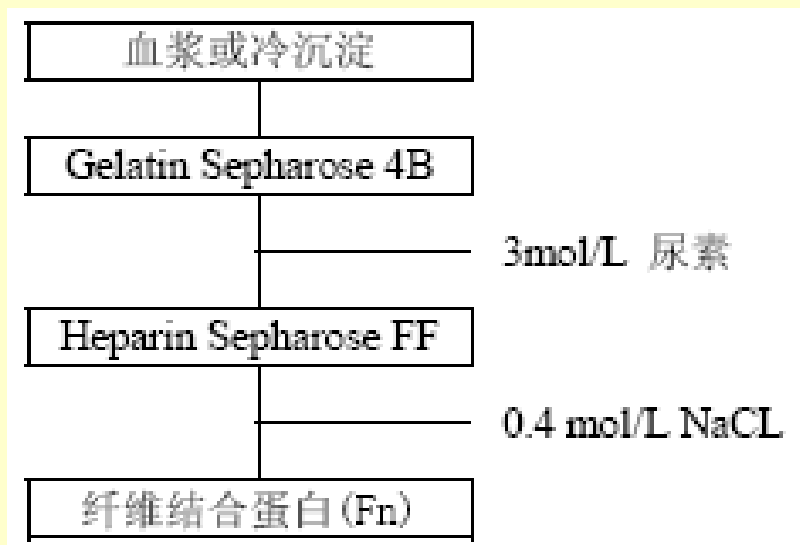
Fig. 1 Affinity chromatography of thrombin protein concentration

1. Heparin - Chitosan;
2. Heparin - Sepharose 4B; — 蛋白浓度; - - 酶活力

纤维结合蛋白 (Fibronectin, Fn)

Fn 是存在于细胞表面和血浆中的高分子糖蛋白。血浆Fn是二聚体，两个亚基在C末端附近通过半胱氨酸残基籍二硫键相连。细胞性Fn以二聚体或多聚体形式存在于许多细胞表面。Fn在治疗疱疹性角膜炎所致的角膜溃疡疱疹及外伤性角膜糜烂糖尿病、患者晶状体摘除后角膜上皮损伤等角膜病有显著疗效。

经研究，Fn分子有和明胶、肝素、纤维蛋白 结合的区域，采用Gelatin Sepharose Heparin Sepharose 亲和层析法可以从血浆或冷沉淀中提取纯化Fn，当然还需要加入病毒灭活步骤。



抗凝血酶III (AT-III)

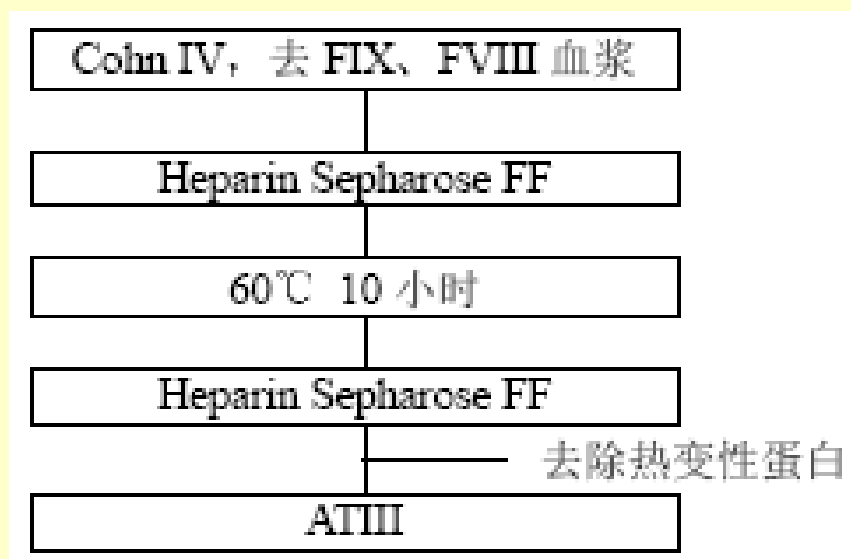
肝素是一种带负电荷的多聚物, 是AT-III的辅因子, 又是许多凝血因子的抑制剂, 因此通过静电和亲和相互作用可分离血浆中的很多因子。

第一个用亲和层析技术从血浆中分离成功的蛋白是AT-III。AT-III最初主要是通过氢氧化铝或磷酸钙等的吸附来制备, 不仅费时费力, 收率低, 且只得到半纯品 (Abildgaard, 1968)。1974年, Miller. Andersson等首次以heparin-Sepharose 4B亲和层析纯化了AT-III, 为以后的大规模制备奠定了基础。之后的分离都是以肝素亲和层析为核心, 辅以其他蛋白纯化技术, 得到纯度、活性均较高的AT-III制品。

AT-III被用于治疗先天性或后天性AT-III 缺乏症患者, 目前普遍采用Heparin Sepharose FF从CohnIV沉淀或去除FIX、FVIII的血浆中提取的方法工艺如下:

名称	分子量(KD)	等电点	正常含量(mg/dl)
AT-III	56		30

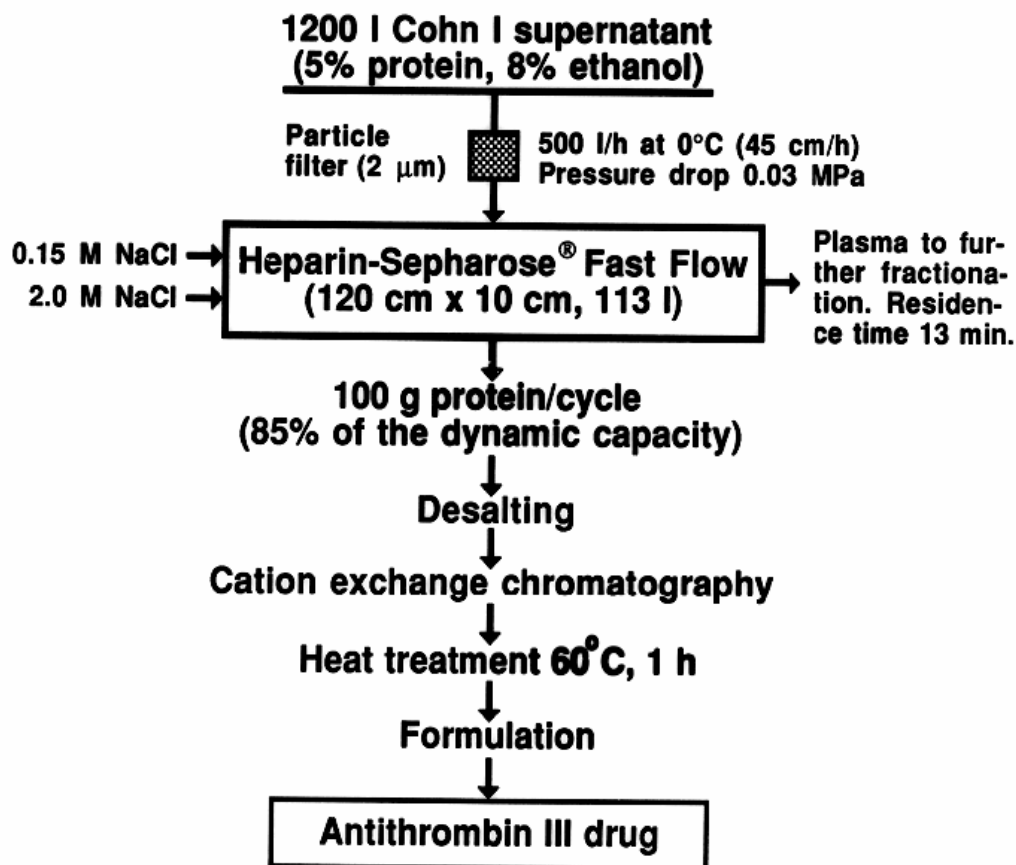
抗凝血酶III纯化工艺



缓冲液	配方
平衡液	0.1mol/L Tris-HCL, 0.01mol/L 柠檬酸钠 0.225 mol/L NaCL, pH 7.4
杂蛋白洗脱液	0.1mol/L Tris-HCL, 0.01mol/L 柠檬酸钠 0.330 mol/L NaCL, pH 7.4
ATIII 洗脱液	0.1mol/L Tris-HCL, 0.01mol/L 柠檬酸钠 2.0 mol/L NaCL, pH 7.4

抗凝血酶III纯化工艺(瑞典)

Purification of Antithrombin III from human plasma (Cohn I)



Courtesy by R. Eketorp, KabiPharma AB, Stockholm, Sweden

层析在血浆蛋白分离中的应用 (T.Burnouf)

从上面的实例中可以看出，层析技术可在多数蛋白的分离纯化中得到应用，有些甚至起到别的方法无法替代的作用。

Table 1
Chromatographic methods in plasma fractionation

	Ion-exchange	Affinity	Size-exclusion	Immuno-affinity	Hydrophobic interaction
Factor VIII	++[5]	+		+[22,23,28]	
Factor IX	++[9-12]	+[9-12]		+[24,25]	
Antithrombin III		++[18-20]			
Von Willebrand Factor	+ [6]	+ [6]			
Alpha I-Antitrypsin	+ [7,8]		+ [8]		
Albumin	+ [17]		+ [16]		
IgG	+ [14]				
C1-inhibitor	+ [16]				+ [27]

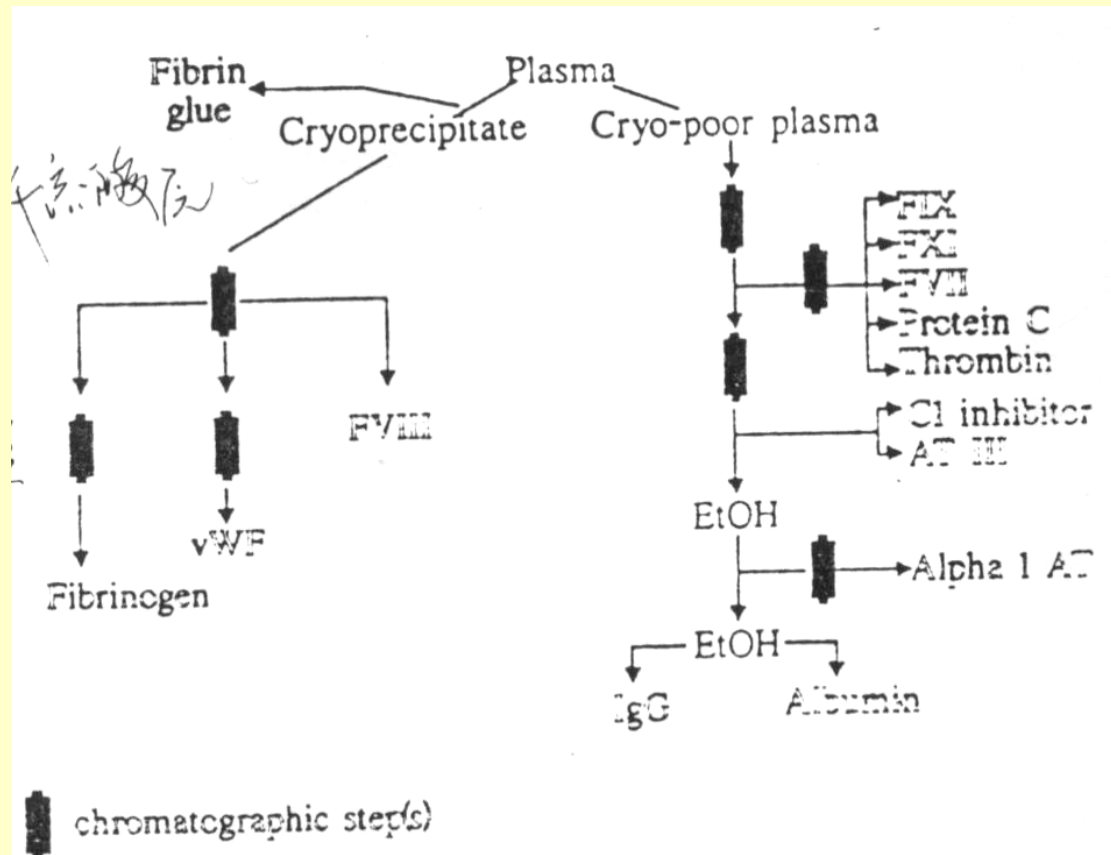
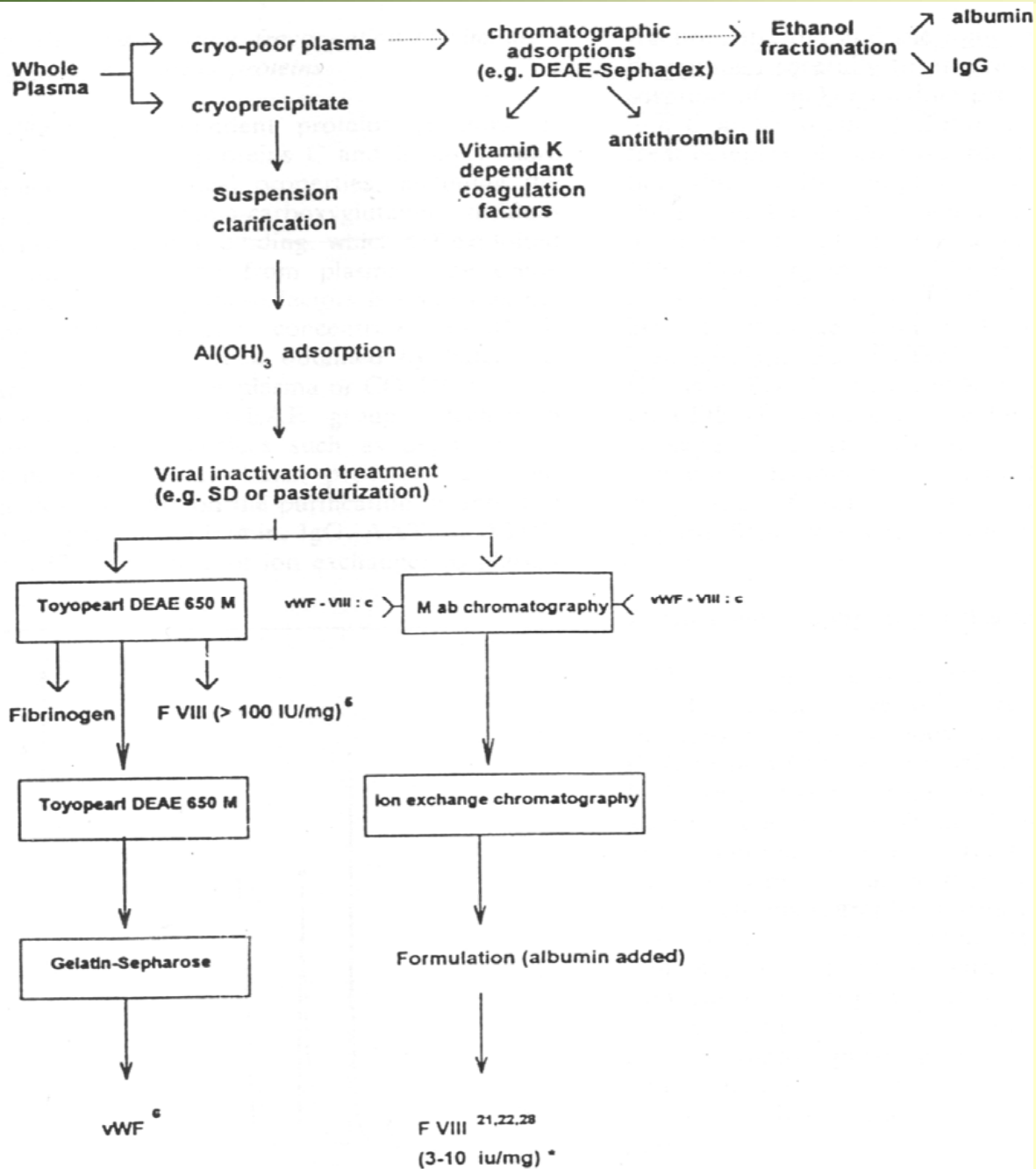


Fig. 1. A modern fractionation scheme of human plasma.



谢谢大家