

·研究简报·

染料壳聚糖微球的制备及其对人血清白蛋白吸附性能研究*

张 静¹ 张政朴^{1**} 贺秉坤²

(¹ 功能高分子材料教育部重点实验室 南开大学高分子化学研究所 天津 300071)

(² 华北制药厂新药中心 石家庄 050015)

关键词 壳聚糖, Cibacron Blue F3GA, 染料亲和吸附剂, HSA

人血清白蛋白(Human Serum Albumin, HSA)是血浆中含量最丰富的蛋白质,约占血浆总蛋白的60%。在人体内,HSA有许多重要的生理功能^[1],临床上广泛应用于手术输血和危重病人补液,治疗创伤休克、烧伤、水肿和低白蛋白血症等,而且能增强人体抵抗能力,是迄今为止产量最大、临床用量最大的药用蛋白。

目前,临床使用的HSA依然由人血浆纯化而得^[2]。然而HSA需求量大,人血来源有限,同时艾滋病及肝炎病毒蔓延速度的加快,更威胁人血液制品的安全性。这些存在于人血浆HSA生产中的问题,促使人们更多地关注注射用基因重组白蛋白(recombinant HSA, rHSA)的开发与研制。rHSA的研究目前集中于用细胞外分泌型的毕氏酵母(*Pichia pastoris*)发酵法制备HSA,其表达量高,分泌的杂蛋白较少,易于纯化,是目前比较好的HSA生产方式,并且有进行大规模生产的潜力。我国已有华北制药集团、上海生物化学研究所等单位对rHSA进行了研究。目前制约rHSA应用于临床的关键是其纯化技术。

由于rHSA的纯化体系复杂,需要采用多步选择性高的纯化方法。为获得高纯度、安全、稳定的产品,各种色谱分离技术得到了更多的应用。仿生亲和分离技术既具有亲和分离技术的优点,又克服了传统亲和分离技术本身需要高度纯化、成本昂贵、生化性质不稳定、生产中难于维持结合活性、也不能经受生产医疗产品必需的在线清洁和消毒等缺点。在配体的选择上,最常用的“基团专一亲和配体”是活性染料,Cibacron Blue F3GA、Procion Blue MX-R、Procion Red HE3B等染料已被广泛应用于蛋白质的纯化^[3-7]。

甲壳素(chitin)是自然界中含量仅次于纤维素的天然多糖,其脱乙酰基产物壳聚糖(chitosan)具有无毒、无味、生物可降解和生物相容性等特性,它们被广泛应用于生物医药、食品、造纸、日用化工等许多领域^[8]。近年来国内外学者对这类资源的改性及应用也做了不少工作,不断开发它在生物和医学等方面的应用。Zeng和Ruckenstein制备了有可控的孔径,良好的机械强度,化学稳定性以及亲水性和生物相容性的壳聚糖膜。这些膜已被用于溶菌酶、血清白蛋白及胰蛋白酶的分离纯化^[9-11]。但是,文献报道的经Cibacron Blue F3GA染料修饰的交联壳聚糖微球(或膜)对白蛋白的吸附量不是很大,Zeng和Ruckenstein用Cibacron Blue F3GA结合的大孔壳聚糖膜为吸附剂得到的HSA吸附量仅为8.4 mg/mL^[11],Baki等用Cibacron Blue F3GA结合交联壳聚糖微球为吸附剂得到的HSA吸附量为15.35 mg/g^[12]。分析其原因,一方面是由于吸附剂负载色素配体的量不够高,另一方面是由于HSA蛋白的分子量较大,占有较大的体积空间,色素配体如仅仅存在于微球的表面,由于位点-位点隔离效应(site-site isolation)会影响其对HSA蛋白分子的吸附。

本文以壳聚糖为原料,制备一系列在空间手臂(space arm)末端以及壳聚糖微球表面均具有游离胺基的壳聚糖衍生物,并偶联色素配体Cibacron Blue F3GA,得到一种新型染料亲和吸附剂。本文选择了临床用量最大的药用蛋白-HSA作为目标蛋白进行吸附试验,发现该新型染料亲和吸附剂对HSA有很高的吸附量以及很高的洗脱率。

1 主要原料

壳聚糖(生化试剂,山东青岛利中壳聚糖厂,

分子量 9.7×10^4 g/mol, 脱乙酰度 85%); span 80 (CP, 天津市天大化工实验厂); 人血清白蛋白 (HSA) (Sigma 试剂, 北京鼎国生物技术发展中心分装); Cibacron Blue F3GA 和 Tris 均为 Sigma 公司产品; 其它试剂均为分析纯。

2 染料亲和吸附剂的制备

染料亲和吸附剂的制备参照文献[13]进行。首先用甲醛与壳聚糖反应生成西佛碱以保护氨基, 再用反相悬浮交联法制备得到保护氨基的戊二醛交联的壳聚糖微球, 在高氯酸存在下使微球

与环氧氯丙烷反应, 通过开环反应使羟丙基氯乙烷接枝在羟基上, 与胺化试剂(1,6-己二胺)反应后脱去甲醛, 得到一系列在空间手臂末端以及壳聚糖微球表面均具有游离胺基的壳聚糖衍生物, 并偶联色素配体 Cibacron Blue F3GA, 得到一种新型染料亲和吸附剂。壳聚糖微球用丙酮在 Soxhlet 提取器中连续提取 24 h, 50℃真空干燥箱烘干, 防止在吸附过程有害物质释出。该吸附剂的化学结构如图 1 所示。

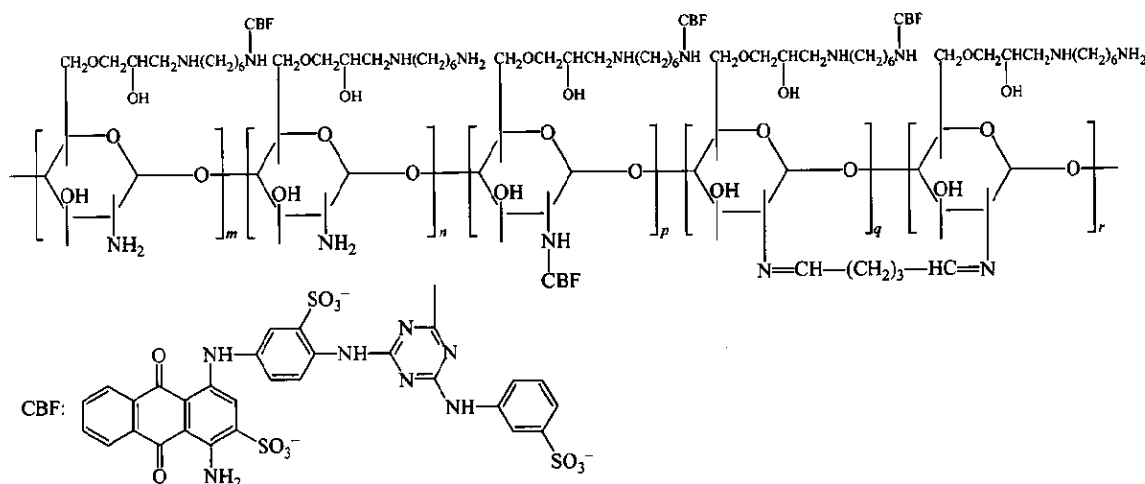


Fig. 1 Chemical structure of Cibacron Blue F3GA-attached chitosan (CBF-CS) microspheres

3 染料亲和吸附剂的表征

以 KBr 压片法, 用红外光谱仪对制备的交联壳聚糖微球及其衍生物进行测定与比较(图 2)。

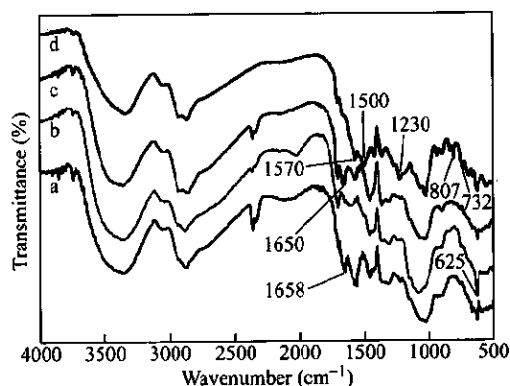


Fig. 2 The FT-IR spectra of different types of chitosan resins

a) Crosslinked chitosan microspheres (CS); b) Epichlorohydrin activated-chitosan microspheres (HPCS); c) Aminated chitosan microspheres by 1,6-hexanediamine (HDA-CS); d) Cibacron blue F3GA-derived chitosan microspheres (CBF-CS)

从图 2 可见, 交联壳聚糖微球(a)1658 cm^{-1} 处有 Schiff 碱($-\text{C}=\text{N}-$)的特征吸收峰, 表明交联反应确已发生。环氧氯丙烷活化的壳聚糖微球(b), 在 625 cm^{-1} 处出现了 $\text{C}-\text{Cl}$ 的伸缩振动峰, 表明活化反应是成功的。胺基化的壳聚糖微球(c), 在 1650 ~ 1590 cm^{-1} 处有 $\text{N}-\text{H}$ 的特征吸收峰, 证明了氨基的存在。染料壳聚糖微球(d)的红外谱图上, 1230 cm^{-1} 处的吸收峰明显增强, 这是 Cibacron Blue F3GA 分子上 $\text{C}-\text{N}$ 的伸缩振动峰。在 1600 ~ 1450 cm^{-1} 处出现的几个中强吸收峰代表了苯环的骨架振动。在 767 cm^{-1} 附近出现的峰为色素分子三嗪环的特征吸收峰。由此证明色素配体的偶联也是成功的。

根据硫元素分析的结果, 计算得到制备的染料壳聚糖微球上最大的染料结合量为 494 $\mu\text{mol/g}$ 。

4 吸附实验

将 100 mg 染料壳聚糖微球置于 50 mL 的锥形瓶中, 加入含 HSA 的缓冲溶液 10 mL, 放入 25℃ 摇床中 (100 r/min), 吸附 24 h 后取上清液, 用 Bradford 描述的考马斯亮兰方法^[14], 用紫外可见

分光光度计测定 595 nm 处吸光度值,并根据标准曲线计算剩余蛋白浓度,从而得到蛋白的吸附量.

在吸附实验中,考察了 HSA 浓度(0.10 ~ 3.0 mg/mL)、pH(4.0 ~ 8.0),采用不同的缓冲溶液进行调节, pH 4.0 ~ 6.0 为 0.1 mol/L CH₃COONa-CH₃COOH, pH 7.0 为 0.1 mol/L KH₂PO₄-K₂HPO₄, pH 8.0 为 0.1 mol/L Tris-HCl 及离子强度(用 0.05 ~ 0.5 mol/L 的 NaCl 调节)对吸附量的影响.

5 洗脱实验

选用 4 种洗脱剂分别为含 0.5 mol/L NaCl, 1.0 mol/L NaCl, 0.5 mol/L NaSCN, 1.0 mol/L NaSCN 的 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲溶液(pH = 8.0)进行洗脱.

将吸附了蛋白质(HSA)的染料壳聚糖微球收集,置于 50 mL 的锥形瓶中,分别加入上述洗脱剂 10 mL,放入 25℃ 摇床中(100 r/min)震荡 1 h 后,取上清液,测定 HSA 的含量,计算洗脱率.

6 染料壳聚糖微球对 HSA 的吸附性能

6.1 HSA 浓度对吸附量的影响 如图 3 所示,随着溶液中 HSA 浓度增大,蛋白的吸附量也增大,HSA 浓度为 2.5 mg/mL 时,基本达到最大平衡吸附量.即使再增大 HSA 的浓度,吸附量也不会再增大.值得注意的是,没有偶联色素配体的交联壳聚糖微球对 HSA 也有一定的吸附,吸附量仅为 10.8 mg/g.偶联了色素配体(cibacron blue F3GA)的壳聚糖微球,由于染料与蛋白分子间的特异性相互作用,大大提高了对 HSA 的吸附量(79.8 mg/g wet beads).

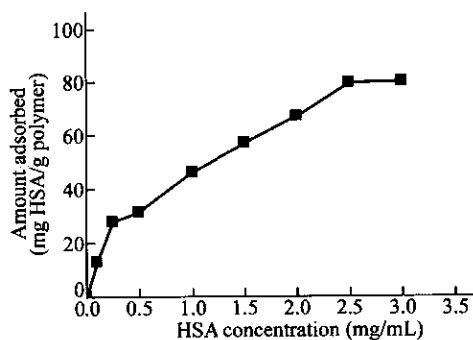


Fig. 3 Effect of HSA initial concentration on HSA adsorption
Dye-ligand content: 494 μmol cibacron blue F3GA/g; pH 5.0; temperature, 25℃; and total volume of protein solution, 25 mL

图 4 是染料壳聚糖微球对 HSA 的吸附等温线^[15].根据 Chase 等提出的理论^[16],色素吸附剂对蛋白质的吸附行为可用 Langmuir 吸附等温式描

述:

$$q = q_m c / (k_d + c)$$

式中 q 为平衡吸附量; q_m 为饱和吸附量; c 为液相蛋白质的平衡浓度; k_d 为解离常数,是解吸和吸附反应速率常数的比值.由图 4 计算可得该染料壳聚糖微球的理论饱和和吸附量(q_m)为 89.3 mg/g,这与实验值比较接近. k_d 为 0.68 mg/mL.

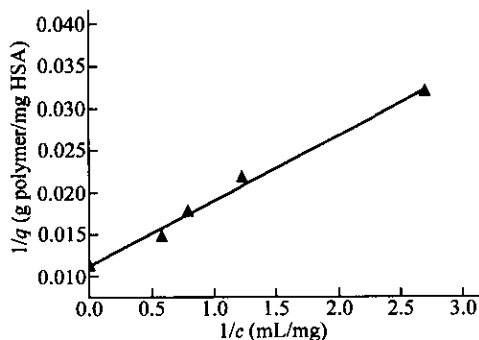


Fig. 4 Linear representation of Langmuir equation of HSA with CBF-CS microspheres

6.2 pH 对吸附量的影响 由图 5 可见, HSA 最大平衡吸附量出现在 pH = 5.0, 也就是 HSA 的等电点.当 pH 大于/小于 5.0 时,由于静电排斥作用的影响,导致 HSA 吸附量降低.当 pH 为 HSA 的等电点时,蛋白上没有净电荷,因此达到最大平衡吸附量^[17~19].此外,该 pH 下配体基团和蛋白分子的氨基酸链的电离状态以及蛋白分子的构象,都会对染料与蛋白分子的相互作用产生影响^[20].

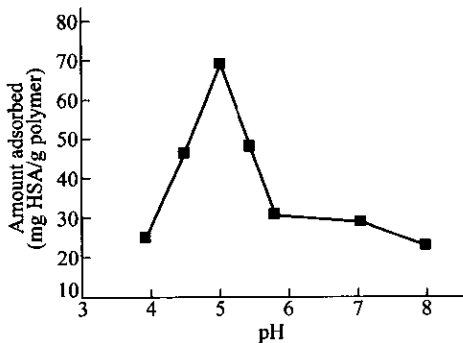


Fig. 5 Effect of pH on HSA adsorption
Dye-ligand content: 494 μmol cibacron blue F3GA /g; HSA initial concentration, 2.5 mg/mL; temperature, 25℃; and total volume of protein solution, 10 mL; adsorption time, 24 h

6.3 离子强度对吸附量的影响 研究表明离子强度对吸附行为有重要的影响.由图 6 可见,随着离子强度的增加, HSA 的吸附量明显减小, NaCl 的浓度从 0.05 mol/L 增加到 0.5 mol/L, 吸附量减

少了 57% .离子强度的影响可以从两个方面来考虑,一方面离子强度的增加使蛋白质分子处于更多的离子氛围中,与配体结合的空间阻碍和静电排斥作用增大;另一方面,盐离子也会与配体分子的某些基团(SO_3^-)相作用,阻碍配体与蛋白质的结合^[15].

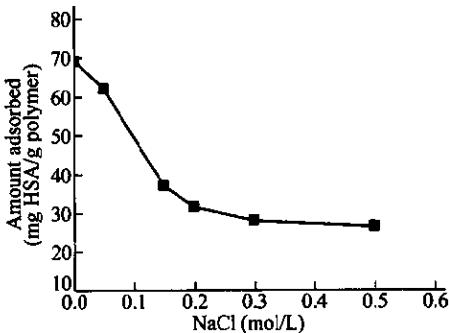


Fig. 6 Effect of NaCl concentration on HSA adsorption
Dye-ligand content: 494 μmol cibacron blue F3GA/g; HSA initial concentration, 2.5 mg/mL; pH 5.0; temperature 25 $^\circ\text{C}$; and total volume of protein solution, 10 mL

7 蛋白质的洗脱及染料壳聚糖微球的重复使用性能

选用的 4 种洗脱剂的洗脱结果见表 1.

Table 1 Desorption ratios of HSA				
Eluent	NaSCN		NaCl	
	1.0 mol/L	0.5 mol/L	1.0 mol/L	0.5 mol/L
Desorption ratio (%)	100	89.9	60.4	40.2

从表 1 可以发现,NaSCN 溶液比 NaCl 溶液对

于 HSA 有更好的解吸作用,浓度较高的 NaSCN 溶液的洗脱效果更好,这种现象可以有如下解释,一方面随着洗脱剂中盐浓度的增加,体系中离子强度也随之增加,使蛋白分子和染料配体间的静电相互作用减弱,同时,离子强度的增加,也会影响蛋白分子的构象,使蛋白的疏水作用减弱从而促进了蛋白的脱附.此外 SCN^- 离子极易与蛋白分子结合,从而大大促进了蛋白的洗脱^[2].

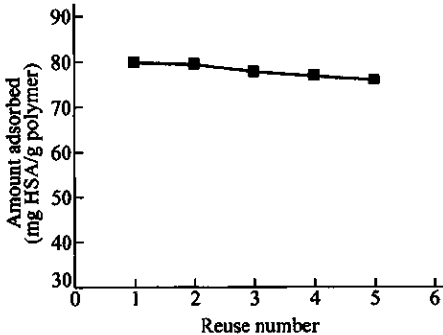


Fig. 7 Repeated use of CBF-CS microspheres
Dye-ligand content: 494 μmol cibacron blue F3GA/g; HSA initial concentration, 2.5 mg/mL; pH 5.0; temperature 25 $^\circ\text{C}$; and total volume of protein solution, 25 mL

为考察吸附剂的重复使用性能,重复吸附-洗脱操作(图 7).结果表明,经过 5 个吸附-洗脱周期后,吸附剂的吸附量仅减少了 4.9%,证明此染料亲和吸附剂的重复使用性能良好.

致谢 本研究工作得到华北制药集团新药基金的赞助.

REFERENCES

1 He X M, Carter D C. Nature, 1992, 358: 209 ~ 215
2 Kassab A, Yavuz H, Odabasi M, Denizli A. J Chromatogr B, 2000, 746: 123 ~ 132
3 Denizli A, Köktürk G, Yavuz H, Piskin E. J Appl Polym Sci, 1999, 74: 2803 ~ 2810
4 Denizli A, Tuncel A, Kozluca A, Ecevit K, Piskin E. Sep Sci Technol, 1997, 32: 1003 ~ 1015
5 Tuncel A, Denizli A, Purvis D, Lowe C R, Piskin E. J Chromatogr, 1993, 634: 161 ~ 168
6 Nash D C, Chase H A. J Chromatogr A, 1997, 776: 55 ~ 63
7 Yavuz H, Duru E, Gençö, Denizli A. Colloids Surf A: Physicochem Eng Aspects, 2003, 223: 185 ~ 193
8 Ravi Kumar M N V, Muzzarelli R A A, Muzzarelli C, Sashiwa H, Domb A J. Chem Rev, 2004, 104: 6017 ~ 6084
9 Zeng X F, Ruckenstein E. Ind Eng Chem Res, 1996, 35: 4169 ~ 4175
10 Zeng X F, Ruckenstein E. Ind Eng Chem Res, 1998, 37: 159 ~ 165
11 Ruckenstein E, Zeng X F. J Membr Sci, 1998, 142: 13 ~ 26
12 Denkbas E B, Odabasi M, Kilicay E, Özdemir N. J Appl Polym Sci, 2002, 86: 3035 ~ 3039
13 Zhang Jing(张静), Zhang Zhengpu(张政朴), Song Yu(宋瑜) He Bingkun(贺秉坤). Chem J Chinese Universities (高等学校化学学报), 2005, 26(12): 2363 ~ 2368
14 Bradford M M. Anal Biochem, 1976, 72: 248 ~ 254
15 Yu Yihua(余艺华), Xue Bo(薛博), Sun Yan(孙彦), He Binglin(何炳林). Acta Polymerica Sinica(高分子学报), 2000, (3): 340 ~ 344

- 16 Chase H A. J Chromatogr, 1984, 297: 179 ~ 202
- 17 Denizli A, Köktürk G, Yavuz H, Piskin E. React Funct Polym, 1999, 40: 195 ~ 203
- 18 Denizli A, Salih B, Piskin E. J Appl Polym Sci, 1997, 65: 2085 ~ 2093
- 19 Denizli A, Salih B, Senel S, Arica M Y. J Appl Polym Sci, 1998, 68: 657 ~ 664
- 20 Lindner N M, Jeffcoat R, Lowe C R. J Chromatogr, 1989, 473: 227 ~ 240

THE PREPARATION OF CIBACRON BLUE F3GA ATTACHED CHITOSAN MICROSPHERES AND THEIR ADSORPTION PROPERTIES FOR HUMAN SERUM ALBUMIN

ZHANG Jing¹, ZHANG Zhengpu¹, HE Bingkun²

(¹ Key Laboratory of Functional Polymer Materials, Ministry of Education,
Institute of Polymer Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071)

(² Research Center for New Drugs, North China Pharmaceutical Corporation, Shijiazhuang 050015)

Abstract A series of aminated chitosan microspheres were prepared from chitosan, and then an affinity dye-ligand, Cibacron Blue F3GA, was covalently coupled. The maximum attachment of cibacron blue F3GA was 494 $\mu\text{mol/g}$. Albumin adsorption onto cibacron blue F3GA-attached chitosan microspheres was investigated. The human serum albumin (HSA) equilibrium adsorption capacity was 79.8 mg/g (wet beads). The adsorption equilibrium isotherms appeared to follow a typical Langmuir isotherm. The highest desorption ratio (100%) was achieved by using an eluent of 1.0 mol/L NaSCN (pH 8.0). The cibacron blue F3GA-attached chitosan microspheres could be reused without significant decreases in the adsorption capacities.

Key words Chitosan, Cibacron blue F3GA, Dye-affinity sorbent, HSA