

重组 SRH 蛋白冻干保护剂的研究

邹民吉 徐 涛 刘 深 付文亮 徐东刚

摘 要 **目的** 筛选并优化重组 SRH 蛋白的冻干保护剂,使其能够保持良好的生物学活性。**方法** 选择不同浓度的冻干保护剂,包括甘露醇、右旋糖酐 40、蔗糖和甘氨酸等组成不同浓度的单一和复合配方,冷冻干燥后检测冻干样品的溶栓活性和成型的变化,同时,冻干样品经过 37℃ 加速实验后,检测其溶栓活性和成型状况的改变,对比分析各组保护剂的效果。**结果** 不同浓度的甘露醇和右旋糖酐 40 对 SRH 蛋白的保护作用良好,没有明显差异,而不同浓度的蔗糖和甘氨酸保护效果较差。复方中以右旋糖酐 40、蔗糖和甘氨酸的复合对目的蛋白的保护作用最好;不同浓度的甘露醇、蔗糖和甘氨酸的复合应用无明显的保护作用。**结论** 以右旋糖酐 40、蔗糖和甘氨酸组成的复合配方对重组 SRH 蛋白的冻干过程有明显的保护作用。

关键词 重组 SRH 蛋白 冻干保护剂 生物活性

Study on Lyophilized Protective for Recombinant Anti - artherosclerosis Protein on the Basis of SAK Backbone. Zou Minji, Xu Tao, Liu Shen, Fu Wenliang, Xu Donggang. Department of Bioengineering, Beijing Institute of Basical Medical Sciences, Beijing 100850, China

Abstract Objective To select a lyophilized protective for recombinant anti - artherosclerosis protein on the basis of SAK backbone. **Methods** Mannitol, dextran 40, sucrose, and glycine in their different concentrations were selected to make up a single recipe or different complex recipes of their concentrations. After lyophilization, the thrombolytic activity and plasticity change should be examined, in the meantime, the lyophilized sample was rapidly thawed at 37℃ and the changes of thrombolytic activity and plasticity also should be examined. **Results** The protective effects on the protein of interest were not significantly different between glycerol and dextran 40 in their different concentrations. Both of them possessed better protective effect, however, that of the sucrose and glycine in different concentrations were less effective. The complex recipe of dextran 40, sucrose and glycine displayed the best protective effect on the protein of interest among the complex recipes, but the complex of glycerol, sucrose and glycine in the different concentrations had no obvious protective effect. **Conclusion** The dextran 40, sucrose and glycine in different concentrations possess a significantly protective effect on the lyophilized process of the recombinant anti - artherosclerosis protein on the basis of SAK backbone.

Key words Recombinant anti - artherosclerosis protein; Lyophilized protective; Biological activity

重组 SRH 蛋白是以改构的葡激酶(staphylokinase, SAK)为骨架融合了 RGD 序列和水蛭素的功能片段而组成的具有溶栓、抗凝和抑制血小板聚集的多功能融合蛋白^[1], 我们已开展的动物实验研究表明, 该重组蛋白不仅降低了 SAK 的免疫源性, 而且拥有良好的治疗动脉粥样硬化作用, 为了进一步的新药应用研究, 我们选择了不同的冻干保护剂组成制剂配方, 研究了它们对目的蛋白的保护作用。

材料与方法

1. 材料: SAK 骨架的多功能蛋白由本研究室构建表达纯化, 20% 甘露醇为石家庄四药有限公司生产, 蔗糖为广东西陇股份有限公司产品, 甘氨酸为美国 Ameresco 公司生产, 西林瓶

为华北制药股份有限公司玻璃厂生产, 右旋糖酐 40 为六安华源制药有限公司生产, 冷冻干燥机由军事医学科学院仪器厂生产。

2. 方法: (1) 溶液配制及配方组成: 配制 40% 蔗糖溶液、0.5mol/L 甘氨酸溶液、10% 右旋糖酐 40 溶液, 并按下表组成不同的冻干保护剂配方: (2) 冷冻干燥: 分装结束后, 将样品置于冷井中密封, 预冻至冷井温度 -67℃, 物料 -63℃, 开始启动干燥程序, 24h 后, 取出样品, 加盖密封。(3) 外观与复溶: 各取 1 支冻干样品, 在 40W 的日光灯下, 观察成型状况, 然后加入 1ml 生理盐水, 在 40W 日光灯下观察样品溶解状况及有无不溶物等。(4) 溶栓活性测定: 称取 125mg 琼脂糖(Biorad 电泳级), 加入 23ml 生理盐水, 煮沸溶解, 60℃ 水浴平衡, 加凝血酶 14μl (100U/ml), 纤溶酶原 280μl (0.5mg/ml), 要边加边摇匀, 加 2.2ml 人纤维蛋白原 (6mg/ml), 不停地摇匀, 混浊后马上倒平板(直径 8cm), 4℃ 冰箱水平放置至少 30min, 充分凝固后待用。将标准品进行对倍稀释, 使参考品浓度依次为: 250、125、62.5、31.25、15.63AU/ml。将重组葡激酶根据标示量稀释至 5μg/ml 的浓度。在形成的纤维蛋白平板内打孔(直

基金项目: 国家科技重大专项、重大新药创制课题(2009ZX09103-623)

作者单位: 100850 北京, 军事医学科学院基础医学研究所

通讯作者: 徐东刚, 电子信箱: xudg@nic.bmi.ac.cn

表 1 不同保护剂的成分组成

编号	蛋白含量 (mg)	甘露醇 (w/v)	右旋糖酐 (w/v)	蔗糖 (w/v)	甘氨酸 (mmol/L)	终体积 (ml)
A1	2.3	2%				1
A2	2.3	3%				1
A3	2.3	4%				1
B1	2.3	3%		1%		1
B2	2.3	3%		2%		1
B3	2.3	3%		3%		1
C1	2.3	3%		1%	10	1
C2	2.3	3%		1%	20	1
C3	2.3	3%		1%	30	1
D1	2.3		2%			1
D2	2.3		3%			1
D3	2.3		4%			1
E1	2.3		3%	1%		1
E2	2.3		3%	2%		1
E3	2.3		3%	3%		1
F1	2.3		3%	1%	10	1
F2	2.3		3%	1%	20	1
F3	2.3		3%	1%	30	1
G1	2.3		2%			1
G2	2.3		3%			1
G3	2.3		4%			1
H1	2.3				267	1
H2	2.3				400	1
H3	2.3				533	1

径 2mm),每孔点样 6μl,每个样品和标准品复孔点样,25℃湿盒水平放置 16h。将点样平板在黑色背景下纵横两次量取溶圈直径,以各个稀释度的活性的对数(x)为横坐标,以溶圈直径的平均数(4 次量取的数值)的对数为纵坐标(y),采用生物统计软件分析结果。利用统计学软件中的回归分析方法作标准曲线,并求得 y = a + bx 中的 a 和 b 及线性回归系数 r 值,根据样品的溶圈直径可求得样品的活性。(5)37℃加速实验:各取 1 支冻干样品置于 37℃温箱中,两周后取出,检测外观和复溶情况,并测定溶栓活性。

结 果

冷冻干燥结束后,各取 1 支冻干样品,在 40W 的日光灯下检测冻干样品的成型状况,并开盖取出样品,观察冻干品的结构形态,另取 1 支,以生理盐水溶解,测定各自的溶栓活性,结果见表 2。将冻干样品各取 1 支,置于 37℃恒温箱中静置 14 天,然后取出,观察样品的形状,并测定溶栓活性,结果见表 3。以上结果显示,不同浓度的甘露醇和右旋糖苷 40 对目的蛋白的保护作用没有明显的差异,均具有较好的保护效果,而不同浓度的蔗糖和甘氨酸对蛋白的保护效果明显低于甘露醇和右旋糖苷 40,当采用不同浓度的保护剂进行复合应用时,右旋糖苷 40、蔗糖和甘胺

酸的复合应用对目的蛋白的保护作用最好,不同浓度的甘露醇、蔗糖和甘氨酸的复合应用则没有明显的改善对蛋白的保护作用。冻干样品的成型状况为 2% 的甘露醇和右旋糖苷 40 较为粗糙,3% 的右旋糖苷 40 和 2%、3% 的蔗糖出现样品的萎缩甚至崩解。冻干样品的溶解性则是除 3% 的甘氨酸有少许不溶物外,其他样品均有良好的复溶性。37℃加速实验结果显示,各制剂配方的蛋白溶栓活性较 37℃处理前没有明显的变化,4% 的蔗糖样品的形状较 37℃处理前出现明显的萎缩,呈结晶状,但其活性没有明显的降低,其他样品均没有明显的变化,详见表 3。

表 2 冻干样品的溶栓活性和成型变化

编号	成型	颜色	形状	复溶情况	溶栓活性 (AU/mg)
A1	粗糙	白色	絮状	无色透明无不溶物	1.2 × 10 ⁴
A2	细致	白色	絮状	无色透明无不溶物	1.2 × 10 ⁴
A3	细致	白色	絮状	无色透明无不溶物	1.2 × 10 ⁴
B1	细致	白色	絮状	无色透明无不溶物	1.3 × 10 ⁴
B2	细致	白色	絮状	无色透明无不溶物	1.3 × 10 ⁴
B3	细致	白色	絮状	无色透明无不溶物	1.4 × 10 ⁴
C1	细致	白色	絮状	无色透明无不溶物	1.4 × 10 ⁴
C2	细致	白色	絮状	无色透明无不溶物	1.3 × 10 ⁴
C3	细致	白色	絮状	无色透明无不溶物	1.3 × 10 ⁴
D1	粗糙	白色	絮状	无色透明无不溶物	9.3 × 10 ³
D2	细致	白色	絮状	无色透明无不溶物	1.4 × 10 ⁴
D3	细致	白色	絮状	无色透明无不溶物	1.4 × 10 ⁴
E1	细致	白色	絮状	无色透明无不溶物	1.3 × 10 ⁴
E2	轻度萎缩	白色	絮状	无色透明无不溶物	1.5 × 10 ⁴
E3	崩解	白色	絮状	无色透明无不溶物	2.1 × 10 ⁴
F1	细致	白色	絮状	无色透明无不溶物	1.8 × 10 ⁴
F2	细致	白色	絮状	无色透明无不溶物	2.2 × 10 ⁴
F3	细致	白色	絮状	无色透明无不溶物	2.0 × 10 ⁴
G1	细致	白色	絮状	无色透明无不溶物	8.2 × 10 ³
G2	细致	白色	絮状	无色透明无不溶物	9.3 × 10 ³
G3	细致	白色	絮状	无色透明无不溶物	8.0 × 10 ³
H1	细致	白色	絮状	无色透明无不溶物	8.2 × 10 ³
H2	细致	白色	絮状	无色透明无不溶物	8.6 × 10 ³
H3	细致	白色	絮状	无色透明有不溶物	8.4 × 10 ³
原液					1.6 × 10 ⁴

讨 论

目前,常用的蛋白冻干保护剂包括糖类及多元醇、聚合物、无水溶剂、表面活性剂、氨基酸以及某些盐和胺^[2,3]。保护剂对蛋白的保护机制主要有两种假说,一是水分子替代假说,即结合水通过氢键与蛋白质分子联接而维持其活性,在冷冻干燥过程中失去水分子后,保护剂的羟基能替代蛋白质表面水的羟基,使蛋白质表面形成一层假定的水化膜,使氢

表 3 冻干样品 37℃加速实验结果

编号	成型	颜色	形状	复溶情况	溶栓活性 (AU/mg)	
A1	粗糙	白色	絮状	无色透明无不溶物	1.2×10^4	
A2	细致	白色	絮状	无色透明无不溶物	1.3×10^4	
A3	细致	白色	絮状	无色透明无不溶物	1.3×10^4	
B1	细致	白色	絮状	无色透明无不溶物	1.3×10^4	
B2	细致	白色	絮状	无色透明无不溶物	1.2×10^4	
B3	细致	白色	絮状	无色透明无不溶物	1.2×10^4	
C1	细致	白色	絮状	无色透明无不溶物	1.2×10^4	
C2	细致	白色	絮状	无色透明无不溶物	1.2×10^4	
C3	细致	白色	絮状	无色透明无不溶物	1.1×10^4	
D1	粗糙	白色	絮状	无色透明无不溶物	1.4×10^4	
D2	细致	白色	絮状	无色透明无不溶物	1.4×10^4	
D3	细致	白色	絮状	无色透明无不溶物	1.4×10^4	
E1	轻度萎缩	白色	絮状	无色透明无不溶物	1.3×10^4	
E2		白色	絮状	无色透明无不溶物	1.3×10^4	
E3		白色	絮状	无色透明无不溶物	1.3×10^4	
F1	细致	白色	絮状	无色透明无不溶物	2.0×10^4	
F2	细致	白色	絮状	无色透明无不溶物	2.2×10^4	
F3	细致	白色	絮状	无色透明无不溶物	2.1×10^4	
G1	细致	白色	絮状	无色透明无不溶物	8.0×10^3	
G2	较细致	白色	絮状	无色透明无不溶物	7.8×10^3	
G3	严重萎缩	白色	晶体状	无色透明无不溶物	8.6×10^3	
H1		细致	白色	絮状	无色透明无不溶物	8.2×10^3
H2		细致	白色	絮状	无色透明无不溶物	8.0×10^3
H3		细致	白色	絮状	无色透明有不溶物	8.0×10^3
原液					1.6×10^4	

键的联接位置不直接暴露在周围环境中,保持了蛋白分子的高级结构,保护蛋白分子的正常活性;二是玻璃态假说,是指在含保护剂溶液的干燥过程中,当浓度足够大且保护剂的结晶不会发生时,保护剂-水混合物就会玻璃化,形成一种在结构上与玻璃状的冰相似的糖类玻璃体,使蛋白分子的链运动受阻,阻止其伸展和沉淀,维持蛋白质分子三维结构的稳定,从而起到保护作用,许多研究结果均可以用这两个假说进行解释^[4~6]。本次实验的结果同样也可以用这两个假说进行解释,但是,当选用 2% 和 3% 蔗糖时,37℃

处理后,样品严重萎缩甚至崩解成晶体状,在这种状态下,并没有降低蛋白的活性,说明 SRH 蛋白分子的高级结构没有发生变化,这种分子间的相互作用机制尚需进一步探讨^[7~9]。所选用的各个单一配方的不同浓度对 SRH 蛋白均有良好的保护作用,保护效果没有明显的差异,除右旋糖酐 40、蔗糖和甘氨酸复合配方外,其他复合配方间也无明显的差异,而右旋糖酐 40、蔗糖和甘氨酸的复合配方对 SRH 蛋白分子具有更好的保护作用,这种复方对 SRH 蛋白的保护机制需要进一步的实验加以解释。

参考文献

1 Wang M, Wang Y, Wang J, Zou M, *et al* Construction and characterization of a novel staphylokinase variant with thrombin - inhibitory activity [J]. *Biotechnol lett*, 2009, 31 (12) : 1923 - 1927

2 朱敖兰, 杨洁. 生物制品冻干保护剂及其保护机理的研究 [J]. 喀什师范学院学报, 2007, 28 (6) : 46 - 50

3 孙东波, 胡一桥. 蛋白质冷冻干燥制品中的保护剂及其保护机理 [J]. 药学进展, 2003, 27 (4) : 201 - 205

4 符桢华, 张凯, 曹昱. 菠萝蛋白酶冻干保护剂研究 [J]. 食品工业科技, 2010, (03) : 268 - 270

5 石晶, 李锐, 马玉杰, 等. 冻干重组碱性成纤维细胞生长因子人血清白蛋白保护剂的研究 [J]. 中国生化药物杂志, 2003, 24 (5) : 244 - 245

6 冯强, 米力, 余晓玲, 等. 抗人肝癌单抗片断抗体 HAab18 (ab') 2 的冻干工艺研究 [J]. 生物技术通讯, 2002, 13 (5) : 356 - 357

7 李德志, 郭大东, 高宏丽, 等. 冻干重组人白细胞介素 - 2 结晶形状的分析 [J]. 齐鲁药事, 2004, 23 (4) : 47 - 48

8 刘国良, 罗家炳, 闫哲, 等. 精制人白细胞干扰素冻干赋形剂初探 [J]. 中国输血杂志, 1995, 8 (1) : 14 - 15

9 方志正, 何建中. 应用正交实验研究麻疹疫苗保护剂和冻干条件 [J]. 中国生物制品学杂志, 1997, 10 (2) : 101 - 104

(收稿: 2011 - 03 - 04)

(修回: 2011 - 03 - 16)

新型 CpG 佐剂——BW006 协同乙型肝炎病毒表面抗原活化小鼠 B、T 淋巴细胞的作用

何 鹏 张现臣 胡忠玉 方 鑫 邱少辉 梁争论

摘 要 目的 探讨新型 CpG 佐剂 BW006 协同乙型肝炎病毒表面抗原 (HBsAg) 对小鼠 B、T 淋巴细胞活化的影响。方法

基金项目: 国家科技重大专项艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治基金资助项目 (2009ZX10004 - 802)

作者单位: 100050 北京, 中国食品药品检定研究院病毒二室

通讯作者: 梁争论, 电子信箱: lzlun@ yahoo. com