

## 中空纤维切向流过滤 高效纯化无脊椎动物血红蛋白



### 简介

输血是最常使用的治疗手段之一，但其常面临季节性短缺以及特殊血型献血不足等问题，在缺乏特定检测及储存设备的欠发达地区，该问题尤为严重。为解决输血制品的经济、安全及供应问题，近年来，科学家开始关注于血红蛋白氧载体（HBOC）的开发。传统的 HBOC 来源主要为哺乳动物，虽具有极大临床潜力，但在制备过程中，不可避免地出现诸多副反应，如血红蛋白（Hb）四聚体解聚，从而渗出血管或肾小管壁，引起组织或肾脏毒性；又或 Hb 被氧化，失去携氧能力；纯化的 Hb 也易受一氧化氮（NO）的影响。

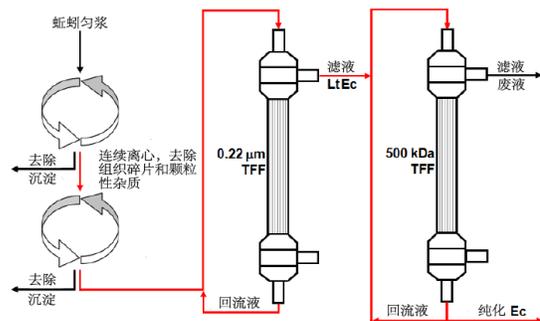
陆生蚯蚓（*Lumbricus terrestris*）没有红细胞，但含有一种独特的血红蛋白，称为无脊椎动物动物血红蛋白（LtEc），其是由 144 个 Hb 亚单位和 36 个交联蛋白组成的大分子，非常稳定，抗氧化，已有实验证明，LtEc 可在小鼠及大鼠体内运输 O<sub>2</sub>，而无明显长期副作用，所以被认为可用于替代捐献来源人体红细胞。

LtEc 应用的前提是建立安全、高效的制备工艺，曾有实验尝试使用体积排阻层析和超速离心，但收率和规模放大性都差强人意。本文尝试使用切向流过

滤（TFF）纯化 LtEc，并测试所得产物的纯度、产量、粘度、高铁血红蛋白水平、胶体渗透压、氧结合平衡以及配体结合动力学等参数，并进行仓鼠输血实验，检测了产物的安全性。

### 实验

每批次实验使用 2L 蚯蚓，漂洗去除泥土和粘液后，均质匀浆，去除固体碎片，上清液再离心后，滤纸过滤，去除较大的颗粒。



实验流程图

初步澄清过滤采用两根并联的 0.2μm 中空纤维切向流过滤组件（产品编号：M1-M02E-360-F1S；膜表面积：1050cm<sup>2</sup>；膜材质：PES），得到 2L 滤液；滤液先用 500kD 中空纤维切向流过滤组件（产品编号：M2-500S-100-01P；膜表面积：1050cm<sup>2</sup>；

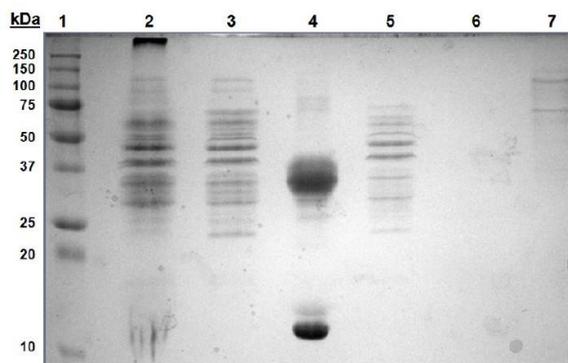
膜材质：PS) 浓缩至 200ml；回流液再进行 10 体积洗滤，前 8 体积使用 Tris 缓冲液，后 2 体积改用改良乳酸林格式溶液。洗滤采用间断模式，即先稀释至 2L 后，再浓缩至 200ml。最后 1 体积洗滤后，回流液浓缩至 20-50ml，再用 0.22 $\mu$ m 针头式滤器除菌过滤。整个切向流过滤工艺流速均稳定为 480ml/min。

纯化后的样品采用 SDS-PAGE 分析蛋白浓缩，以氰化高铁血红蛋白测定法检测氧化 LtEc (MetHb) 水平，以 MALDI-MS 分析样品分子量，以血分析仪分析 O<sub>2</sub> 平衡曲线和结合/解离动力学，并测试产物粘度和胶体渗透压。

此外，使用仓鼠进行纯化 LtEc 的超容量输血实验，输血过程监测血浆蛋白浓度，并监测平均动脉血压 (MAP)、心率 (HR)、功能性毛细血管密度 (FCD)、动/静脉血液流速等指标。

## 结果

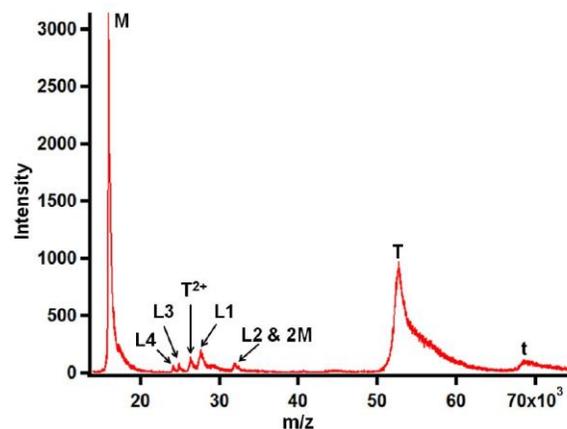
SDS-PAGE 结果显示，使用 0.2 $\mu$ m 过滤器进行澄清可去除大分子量的凝血蛋白聚合物等杂质，多次洗滤后，小分子杂质亦可去除，而 LtEc 被浓缩，且所得产物条带分子量与理论值基本一致。



SDS-PAGE 电泳图，第 2 道为 0.2 $\mu$ m 过滤器澄清后回流液，可见分子量较大的凝血蛋白聚合物杂质，第 3 道为澄清后的滤液，无大分子杂质，第 4 道为洗滤后回流液，可见有较大 LtEc 亚单位条带，而不同洗滤阶段滤液中（第 5、6、7 道）的小分子杂质亦明显降低。

MALDI-MS 结果也证明，所得产物分子量与理论值符合，且无较大杂质峰存在。每批次 LtEc 的收率

为 5g 左右，且 metHb 含量极低 (~3%)。说明 TFF 在保证收率的同时，可最大程度地维持 LtEc 的稳定性。纯化 LtEc 的 O<sub>2</sub> 亲和性 (P<sub>50</sub>) 与 bHb 或人全血相似，O<sub>2</sub> 释放常数也无太大差异，而 CO 结合常数显著较低，也不易受 NO 攻击。



纯化 LtEc MALDI-MS 图，MW 范围 10-75kD，M 为单体，T 为三聚体，t 为四聚体，L 为交联蛋白，其分子量与理论值一致。

实验通过仓鼠输血模型检测纯化 LtEc 的安全性，结果显示，无显著免疫或过敏反应发生，从 MAP 及血管直径参数看，LtEc 不会造成血管紧缩或高血压，反而在较高血浆浓度条件下，血管会轻微舒张。LtEc 不会引起 HR 降低，升高浓度后，动脉血液流速加快，此外，一定浓度的 LtEc 可增加 FCD，说明其可纠正失血性休克时的毛细血管塌陷问题。

## 讨论

TFF 纯化工艺可用于制备高纯度的完整 LtEc，且纯化的 LtEc 可有效结合并释放 O<sub>2</sub>，其 O<sub>2</sub> 亲和性与人体全血相近，而不易受 CO 攻击，表明其是高效的体内 O<sub>2</sub> 载体。纯化 LtEc 的粘度和 COP 也与人体全血接近，这使其在输血治疗出血性休克时，可将液体有效驱入毛细血管，提高循环体积，维持 FCD，恢复 O<sub>2</sub> 输送。在仓鼠输血实验中，也未观察到高血压、血管紧缩或过敏反应等现象，证实了纯化 LtEc 的安全性。可见，TFF 是 LtEc 纯化的高效手段，可进行进一步的规模放大实验。