

李 辉,果双双,施振旦. 重组猪抑制素蛋白冻干保护剂的筛选[J]. 江苏农业科学,2016,44(4):291-293.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.04.082

重组猪抑制素蛋白冻干保护剂的筛选

李 辉¹, 果双双², 施振旦¹

(1. 江苏省农业科学院畜牧研究所, 江苏南京 210014; 2. 山东农业大学动物科技学院, 山东泰安 271018)

摘要:为提高蛋白质的稳定性,便于运输和延长储存时间,冷冻干燥是目前公认最可行的技术之一。通过对猪重组抑制素蛋白冻干燥后的外观、色泽、复水性以及 SDS-PAGE 电泳检测,对 27 种常用冻干保护性物质进行筛选。结果表明,可溶性淀粉和 β -环糊精的保护效果较好,表现在外形饱满无坍塌、色泽细腻白亮、复溶后无沉淀、电泳检测发现蛋白条带无降解。将筛选出的 2 个保护剂制备成冻干样品放置于 37 °C 烘箱中,进行加速稳定性试验。结果表明,在 37 °C 放置 4 个月后,冻干蛋白样品保持形态色泽不变,复溶后无沉淀,蛋白无降解现象。

关键词:重组猪抑制素;冷冻干燥;冻干保护剂;复水性;稳定性

中图分类号: Q51 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)04-0291-03

抑制素是一种主要由雌性动物卵泡颗粒细胞和雄性动物睾丸支持细胞分泌的糖蛋白激素^[1],主要通过负反馈作用抑制垂体 FSH、LH 的分泌^[2]。通过主动或被动免疫抑制素,可促进垂体 FSH、LH 分泌,从而促进动物的繁殖活动^[3-6]。因此在实际生产中可以通过注射重组抑制素的方法,利用动物的免疫机能,降低体内抑制素水平,提高动物生产力^[7-8]。笔者所在实验室在前期研究的基础上进行了重组猪抑制素蛋白的大规模发酵制备研究,已经制备了大量纯度较高重组蛋白。但是作为一种生物制品,应用于生产中尚存在溶液性蛋白稳定性差、远距离运输和储存过程中受温度影响较大等缺陷^[9],因此,常通过冷冻干燥的方法制成冻干品以避免^[10]。

冷冻干燥的基本原理是将蛋白溶液在低温下冻结,真空条件下干燥而形成固体制剂。干燥过程又分为 2 步:移除结晶水的初步干燥和移除结合水的二次干燥^[11]。然而冷冻干燥操作本身也会影响蛋白质的稳定性,具体在于冷冻过程和干燥过程。在冷冻过程中,主要是冰晶的形成、离子强度的增加、pH 值的改变和相分离等影响因素^[12]。而在干燥过程中,尤其是在二次干燥即移除结合水的过程中,蛋白的水化膜被破坏,导致蛋白质表面的氢键遭到破坏,引起蛋白质天然结构发生改变,从而影响电荷分布,导致蛋白变性凝聚^[9]。经过冷冻后的蛋白质多出现溶解度差、生物活性下降甚至降解等问题。因此,在冷冻干燥过程中常在蛋白质溶液中添加糖类、氨基酸类、蛋白类和高分子化合物等保护剂,以减少或者阻止冷冻和干燥过程中对蛋白质的损伤^[13]。

本研究着重对重组猪抑制素蛋白的冻干保护剂进行筛选,以期筛选出 1 种或几种具有良好保护效果的保护剂,为实际生产中的大规模推广应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 纯化重组猪抑制素蛋白溶液(浓度 5 mg/mL)由笔者所在实验室保存。其他所用试剂均为国产分析纯。

1.1.2 仪器 真空冷冻干燥机(LGJ-12,北京松源华兴科技发展有限公司);垂直电泳系统(北京六一仪器厂);凝胶成像系统(Tanon1600,上海天能科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 样品的处理 将 27 种待测冻干保护剂按 3% (m/V) 比例分别添加到重组猪抑制素蛋白溶液中,待保护剂完全溶解后,用 0.22 μ m 细菌过滤器过滤除菌并分装至 1.5 mL 的无菌离心管内备用,每管 1 mL。

1.2.2 冻干处理 冻干过程中有常规工艺,流程如下:(1)预冻。将分装好的样品,放入 -80 °C 冰箱中预冻,使样品完全结冰;同时,打开冷冻干燥机的压缩机,使冻干机的冷阱温度降至 -50 °C 以下。(2)升华干燥。将预冻好的样品打开盖子,迅速放入冻干机的搁板上并盖上真空罩,开启真空泵抽真空,使真空度降至 1 Pa,并保持 12 h;待样品完全干燥后,取出样品盖上盖子,4 °C 保存备用。

1.3 冻干样品的检测

1.3.1 外观检查 应以白色疏松体、骨架成型好、无坍塌、外形细致为好。

1.3.2 复水性检查 取 1 mL 蒸馏水加入冻干样品中,应以迅速溶解、无沉淀为好。

1.3.3 蛋白稳定性检查 取复水后的样品进行 SDS-PAGE 检测,以无降解条带为好。

1.3.4 37 °C 加速稳定性试验 通过外观、复水性和蛋白稳定性检查后,筛选出较好的组放入 37 °C 培养箱中进行加速稳定性试验,时间为 4 个月,每个月定期取样并重复上述检测。

2 结果与分析

2.1 外观及复水性检查

添加冻干保护剂的冻干制品均为白色疏松体,但大部分

收稿日期:2015-03-02

基金项目:国家自然科学基金(编号:31402080);江苏省自然科学基金(编号:BK20151365)。

作者简介:李 辉(1982—),男,山东惠民人,博士,副研究员,从事动物繁殖研究。Tel:(025)84390772;E-mail:lhlydk@126.com。

通信作者:施振旦,研究员。E-mail:zdshi@scau.edu.cn。

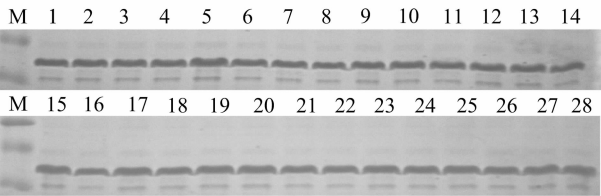
表现出坍塌、中空,样品呈丝状或絮状。而添加甘露醇、PEG 系列、甘氨酸、磷酸氢二钠、L-半胱氨酸、可溶性淀粉和β-环糊精组表现出细致粉状,不易松散,样品表面整齐、光滑、无肉眼可见细孔。冻干样品加水后均能迅速溶解,但有少量沉淀,仅添加可溶性淀粉和β-环糊精组能彻底溶解。对照组则呈现出微黄色絮状,加水后漂浮于液面之上,经超声波及加热助溶后仍不溶解(表 1)。上述结果说明可溶性淀粉和β-环糊精对重组猪抑制素蛋白的冷冻干燥具有较好的保护作用。

表 1 不同冻干保护剂对重组猪抑制素的保护效果

编号	保护剂	冻干后形状	成型	颜色	复水性
1	蔗糖	坍塌,丝状	粗糙	白色	瞬溶
2	海藻糖	坍塌,絮状	粗糙	白色	瞬溶
3	乳糖	坍塌,絮状	粗糙	白色	瞬溶
4	葡萄糖	坍塌,絮状	粗糙	白色	瞬溶,有不溶物
5	麦芽糖	坍塌,絮状	粗糙	白色	慢溶,有不溶物
6	甘露醇	较好,絮状	细致	白色	瞬溶,有不溶物
7	山梨醇	坍塌,絮状	粗糙	白色	瞬溶,有不溶物
8	苯甲酸钠	坍塌,絮状	粗糙	白色	瞬溶,有不溶物
9	PEG4000	较好,粉状	细致	白色	瞬溶,有不溶物
10	PEG6000	较好,粉状	细致	白色	瞬溶,有不溶物
11	PEG20000	较好,粉状	细致	白色	瞬溶,有不溶物
12	甘油	坍塌,絮状	粗糙	白色	瞬溶,有不溶物
13	DMSO	坍塌,絮状	粗糙	白色	瞬溶,有不溶物
14	Tween 80	坍塌,絮状	粗糙	白色	瞬溶,有不溶物
15	Tween 20	坍塌,絮状	粗糙	白色	瞬溶,有不溶物
16	甘氨酸	较好,粉状	细致	白色	瞬溶,有不溶物
17	磷酸氢二钠	较好,粉状	细致	白色	瞬溶,有不溶物
18	L-精氨酸	坍塌,絮状	粗糙	白色	瞬溶
19	L-半胱氨酸	较好,絮状	细致	白色	瞬溶,有不溶物
20	可溶性淀粉	很好,粉状	细致	白色	瞬溶
21	β-环糊精	很好,粉状	细致	白色	瞬溶
22	棉籽糖	较好,丝状	粗糙	白色	瞬溶,有不溶物
23	磷酸甘油	坍塌,絮状	粗糙	白色	瞬溶
24	磷酸二氢钠	坍塌,絮状	粗糙	白色	瞬溶
25	碳酸氢钠	坍塌,絮状	粗糙	白色	瞬溶,有不溶物
26	柠檬酸三钠	坍塌,絮状	粗糙	白色	瞬溶,有不溶物
27	PVP	坍塌,絮状	粗糙	白色	瞬溶
28	无	坍塌,絮状	粗糙	微黄	不溶

2.2 蛋白稳定性检查

加水溶解后的样品进行 SDS-PAGE 检测,结果发现添加冻干保护剂的试验组中蛋白条带无降解(图 1)。



M—Marker; 1~27—分别代表添加不同冻干保护剂的冻干蛋白样品; 28—未冻干蛋白原液

图1 冻干重组猪抑制素蛋白稳定性检测

2.3 37 ℃加速稳定性试验

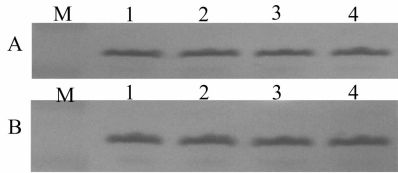
将筛选出的可溶性淀粉和β-环糊精 2 组放入 37 ℃烘箱进行处理。经检测发现,保存 1~4 个月冻干品的外观形态、颜色、复水性以及蛋白的稳定性无明显变化(表 2、图 2)。

3 讨论

蛋白溶液类药物的运输和储存对外界环境(尤其是对温

表 2 37 ℃加速试验对冻干样品的影响

处理时间 (月)	结果	
	可溶性淀粉	β-环糊精
1	白色,骨架稳定,致密,瞬溶	白色,骨架稳定,致密,瞬溶
2	白色,骨架稳定,致密,瞬溶	白色,骨架稳定,致密,瞬溶
3	白色,骨架稳定,致密,瞬溶	白色,骨架稳定,致密,瞬溶
4	白色,骨架稳定,致密,瞬溶	白色,骨架稳定,致密,瞬溶



M—marker; A—添加可溶性淀粉; B—添加β-环糊精; 1~4分别代表处理1~4个月

图2 37 ℃加速处理后冻干重组猪抑制素蛋白的稳定性检测

度)的要求较苛刻,因此一般须在 2~8 ℃环境下储运。而经过干燥处理后,在保证蛋白质活性和复水性不变的前提下可降低环境温度的影响,而且冻干后的蛋白质量较轻,可降低运输成本。目前的干燥技术有喷雾干燥^[14-15]、喷雾-冷冻干燥^[16-18]、流化床干燥^[19]和冷冻干燥等几种,其中应用最广泛的是冷冻干燥。冷冻干燥是通过抽真空而降低水的沸点,使样品中的冰直接升华为水蒸气的方法。因为在样品冻结状态,且在接近真空的条件下进行,所以冷冻干燥具有其他方法所不能比拟的优势,例如:保证了蛋白质的生物活性、损失少、体积不改变、冻干产品为多孔状、易溶、样品氧化少、干燥彻底等^[11,20]。据国家食品药品监督管理总局信息,目前我国已经批准上市的冻干蛋白类药物产品有重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子、注射用重组人干扰素α2b、鼠表皮生长因子、外用重组人表皮生长因子、注射用重组链激酶、注射用重组人白介素-2、注射用重组人生长激素、人凝血因子Ⅷ、人纤维蛋白原等。

在冷冻干燥过程中需要添加保护剂以尽可能维持蛋白的生物学活性和溶解性。关于保护剂可保护冷冻干燥中蛋白质稳定的机制,目前主要有 2 种观点:(1)具有黏性的保护剂包围在蛋白质分子周围,组织蛋白质的伸展和沉淀,也称之为玻璃态假说;(2)蛋白质分子中存在着大量氢键,结合水通过氢键与蛋白质分子连接,当蛋白质在冷冻干燥过程中失去水分后,保护剂能替代水分子,保持氢键的连接,使蛋白质分子不直接暴露在外,也称之为水替代假说。目前大多数学者较认可后者。因此一些容易生成氢键的多羟基化合物,如糖类、多元醇、一些氨基酸、蛋白质^[21-24]和盐类等成为冻干保护剂的首选^[25-26]。此外,冻干保护剂的选择还要力求成本低廉、无污染以及配方简单。有研究发现,保护剂的分子量也会影响蛋白的冻干及冻干后蛋白稳定性,Tonnis 等对分子量从 6 ku 到 540 ku 的糖类进行研究,发现并非分子量越大的糖保护效果越好,而是糖链较柔软易弯曲的糖类保护效果较好^[9]。通过对重组猪抑制素的冻干研究,筛选出的可溶性淀粉和β-环糊精具有较好的保护效果。这 2 种物质也常用作食品和药品的辅料和增容剂,其具有较好保护效果可能与其空

间位阻小, 较容易随蛋白质的空间结构折叠而折叠有关。NaCl 在冻干过程中也起重要作用, Andrea 等研究发现, 无 NaCl 冻干样品表现出外形致密水晶状, 冻干时间较长。当 NaCl 含量升高至 0.3% 时, 冻干品呈现出光滑疏松的网状结构, 因此相对于无 NaCl 样品, 冻干速度更快^[13]。本研究将蛋白质溶解于 NaCl 浓度为 0.9% 的生理盐水中, 冻干过程中的表现与 Andrea 等的结果一致。

我国大部分的地区夏季气温最高在 37℃, 在冻干蛋白药品运输储存时一般不高于此温度, 因此选择 37℃ 作为加速稳定试验的温度。通过试验发现, 冻干品 37℃ 处理 4 个月不影响外观及稳定性。董世娟等在重组猪 IFN α 的冻干研究中发现添加 2%~5% 的甘露醇作为保护剂具有较好的保护效果, 在 40℃ 加速稳定试验 3 个月后, 冻干品稳定性无明显变化^[27]。邹民吉等对重组 SRH 蛋白同样在 37℃ 进行加速稳定试验, 发现右旋糖苷 40、蔗糖和甘氨酸组成的保护剂具有较好的保护效果^[28]。张雪梅等筛选出 15 mmol/L 精氨酸 + 10 mmol/L 谷氨酸 + 4% 甘露醇 + 1% 蔗糖/海藻糖, 然后放置于 40℃ 处理 12 个月不影响蛋白稳定性^[29]。说明添加保护剂冻干后的蛋白在室温下稳定性很高, 即便提高保存温度, 药品的稳定性也不受影响。

随着基因工程技术的进步, 越来越多人类急需的蛋白质药物开发出来。针对不同的蛋白需要量身定做高效的冻干保护剂。尽管目前已经在该领域取得了令人欣喜的进步, 但是对于其保护机理仍未清晰。因此未来的主要研究方向将是攻克保护机理, 然后通过对蛋白质分子的氨基酸构成以及三维空间结构的分析, 对应性地设计一些高效冻干保护剂, 进一步提高冻干产品的品质。

参考文献:

- [1] Walton K L, Makanji Y, Robertson D M, et al. The synthesis and secretion of inhibins[J]. *Vitamins and Hormones*, 2011, 85: 149–184.
- [2] Woodruff T K, Mather J P. Inhibin, activin and the female reproductive axis[J]. *Annual Review of Physiology*, 1995, 57: 219–244.
- [3] Li D R, Qin G S, Wei Y M, et al. Immunisation against inhibin enhances follicular development, oocyte maturation and superovulatory response in water buffaloes [J]. *Reproduction Fertility and Development*, 2011, 23(6): 788–797.
- [4] Sasaki K, Medan M S, Watanabe G, et al. Immunization of goats against inhibin increased follicular development and ovulation rate [J]. *The Journal of Reproduction and Development*, 2006, 52(4): 543–550.
- [5] Medan M S, Takedom T, Aoyagi Y, et al. The effect of active immunization against inhibin on gonadotropin secretions and follicular dynamics during the estrous cycle in cows [J]. *The Journal of Reproduction and Development*, 2006, 52(1): 107–113.
- [6] Medan M S, Watanabe G, Nagura Y, et al. Effect of active immunization against inhibin on hormonal concentrations and semen characteristics in Shiba bucks[J]. *Theriogenology*, 2006, 65(4): 691–702.
- [7] Liu Y P, Mao X B, Wei Y M, et al. Studies on enhancing embryo quantity and quality by immunization against inhibin in repeatedly superovulated Holstein heifers and the associated endocrine mechanisms[J]. *Animal Reproduction Science*, 2013, 142(1/2): 10–18.
- [8] Mei C, Li M Y, Zhong S Q, et al. Enhancing embryo yield in superovulated Holstein heifers by immunization against inhibin [J]. *Reproduction in Domestic Animals*, 2009, 44(5): 735–739.
- [9] Tonniss W F, Mensink M A, De Jager A, et al. Size and molecular flexibility of sugars determine the storage stability of freeze-dried proteins[J]. *Molecular Pharmaceutics*, 2015, 12(3): 684–694.
- [10] Wang W. Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2000, 203(1/2): 1–60.
- [11] 于亚云, 段姚尧, 崔颖. 蛋白类药物冷冻干燥技术的研究进展[J]. *武警医学院学报*, 2010, 19(1): 78–80, 84.
- [12] 张敬如, 黄复生, 王昆. 蛋白质药品的真空冷冻干燥技术及研究进展[J]. *中国药业*, 2006, 15(13): 25–27.
- [13] Hawe A, Friess W. Physico-chemical lyophilization behavior of mannitol, human serum albumin formulations[J]. *European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 2006, 28(3): 224–232.
- [14] 李伟锋, 王鹏, 徐幸莲, 等. 喷雾干燥鸡血浆蛋白粉工艺优化[J]. *农业工程学报*, 2012, 28(21): 248–255.
- [15] 白洁, 何应. 喷雾干燥技术在蛋白、多肽类药物微球制备中的应用[J]. *药学进展*, 2007, 31(7): 298–302.
- [16] 杜祯, 郑颖, 黎畅明, 等. 喷雾冷冻干燥技术进展及其在药剂学中的应用[J]. *中国药学杂志*, 2009, 44(10): 724–727.
- [17] 董梅, 李保国, 应月. 喷雾冷冻干燥技术及在药物微球制备中的应用举例[J]. *制冷技术*, 2009, 29(2): 22–25.
- [18] 江荣高, 刘衡, 王立青, 等. 喷雾冷冻干燥法制备供吸入的超轻干扰素粉末[J]. *中国药学杂志*, 2007, 42(5): 362–364.
- [19] 史锋, 王璋, 许时婴. 用流化床干燥法改善颗粒酶的热稳定性[J]. *无锡轻工大学学报*, 2002, 21(1): 27–32.
- [20] 周初, 李臻峰, 李静, 等. 真空冷冻干燥技术的研究进展[J]. *黑龙江科技信息*, 2014(30): 76–77.
- [21] Izutsu K I, Kojima S. Excipient crystallinity and its protein-structure-stabilizing effect during freeze-drying[J]. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2002, 54(8): 1033–1039.
- [22] Johnson R E, Kirchhoff C F, Gaud H T. Mannitol-sucrose mixtures—versatile formulations for protein lyophilization[J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2002, 91(4): 914–922.
- [23] Kasraian K, Spitznagel T M, Juneau J A, et al. Characterization of the sucrose/glycine/water system by differential scanning calorimetry and freeze-drying microscopy[J]. *Pharmaceutical Development and Technology*, 1998, 3(2): 233–239.
- [24] Pikal M J, Dellerman K M, Roy M L, et al. The effects of formulation variables on the stability of freeze-dried human growth hormone[J]. *Pharmaceutical Research*, 1991, 8(4): 427–436.
- [25] Mazzobro M F, Longinotti M P, Corti H R, et al. Effect of salts on the properties of aqueous sugar systems, in relation to biomaterial stabilization. 1. Water sorption behavior and ice crystallization/melting[J]. *Cryobiology*, 2001, 43(3): 199–210.
- [26] Telang C, Yu L, Suryanarayanan R. Effective inhibition of mannitol crystallization in frozen solutions by sodium chloride[J]. *Pharmaceutical Research*, 2003, 20(4): 660–667.
- [27] 董世娟, 朱于敏, 于瑞嵩, 等. 重组猪 α 干扰素冻干保护剂的筛选[J]. *中国兽药杂志*, 2010, 44(3): 37–40.
- [28] 邹民吉, 徐涛, 刘深, 等. 重组 SRH 蛋白冻干保护剂的研究[J]. *医学研究杂志*, 2011, 40(11): 25–27.
- [29] 张雪梅, 石晓丽, 姚为民, 等. 聚乙二醇-重组人干扰素 α 2b 结合物冻干保护剂的筛选[J]. *中国生物制品学杂志*, 2008, 21(10): 887–889.