

# 毕赤酵母系统来源的重组人血清白蛋白的制备及初步晶体学分析

陈 蕴<sup>1</sup>, 黄鹏飞<sup>1</sup>, 郭瑞庭<sup>2</sup>, 金 坚<sup>1\*</sup>

(1. 江南大学 药学院, 江苏 无锡 214122; 2. 中国科学院 天津工业生物技术研究所, 天津 300308)

**摘要:** 人血清白蛋白(human serum albumin, HSA), 为血浆中含量最丰富的蛋白质, 具有调控血液中的功能蛋白质、脂肪酸、激素、药物和维持血液渗透压功能。毕赤酵母工程菌 *Pichia pastoris* GS115/pPIC9K-rHSA 经 50 L 发酵罐发酵, 发酵液冷冻离心, 上清液超滤浓缩后, 依次通过 Blue Sepharose 6FF 亲和层析、Phenyl Sepharose 6FF 疏水层析和 SP Sepharose 6FF 离子层析纯化, 实现 rHSA 的规模化制备, 最终 rHSA 的纯度可达 99.9% 以上。通过 rHSA 的结晶条件筛选实验, 筛选出沉淀剂分别为 PEG 1500、PEG 3350、PEG 6000、MPEG 2000 和 MPEG 5000 五种结晶条件, 结晶环境均为疏水性环境, 并且结晶环境不能含有类似 DTT 的强还原剂。其中沉淀剂为 MPEG 2000 条件下优化出的 rHSA 和 pHSA 蛋白晶体经 X 光衍射分辨率最好, 分别为 3.4 Å 和 3.1 Å, 通过分子置换法得到 rHSA 和 pHSA 的晶体结构, 二者结构大体相似, 为 rHSA 在临床上的应用和 HSA 融合蛋白的晶体结构研究提供可靠的依据和基础。

**关键词:** 人血清白蛋白; 纯化; 结晶; 晶体结构; 融合蛋白

**中图分类号:** R 915 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2015)02—0151—07

## Preparation and Crystallographic Studies of Recombinant Human Serum Albumin in *Pichia pastoris*

CHEN Yun<sup>1</sup>, HUANG Pengfei<sup>1</sup>, GUO Reiting<sup>2</sup>, JIN Jian<sup>1\*</sup>

(1. School of Pharmacy, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 3003008, China)

**Abstract:** Human serum albumin (HSA), the most abundant protein in plasma, with functions of regulating blood protein, fatty acids, hormones, drugs, and representing the main determinant of plasma oncotic pressure, providing a depot and carrier for many endogenous and exogenous compounds. The engineering *pichia pastoris* GS115/pPIC9K-rHSA was fermented by 50 L fermentor. Highly purified rHSA was separated from fermentation supernatant by ultra filter, Blue sepharose affinity chromatography, Phenyl sepharose hydrophobic chromatography and SP sepharose ion exchange chromatography purification. Eventually the purity of rHSA can reach more than

收稿日期: 2014-01-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(81273437)。

\* 通信作者: 金 坚(1960—), 男, 江苏苏州人, 医学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事长效蛋白重组药物与肿瘤多药耐药机制方面的研究。E-mail: jinjian31@126.com

99.9%. Through screening crystallization conditions of rHSA, five conditions with precipitant of PEG 1500, PEG 3350, PEG 6000, MPEG 2000 and MPEG 5000 were obtained. The crystallization condition was hydrophobic and without strong reductant like DTT. Crystals of rHSA and pHSA with precipitant of MPEG 2000 were best for X ray diffraction, respectively the resolution were 3.4 Å and 3.1 Å. Crystal structure of rHSA and pHSA were the same as a whole that obtained through molecular displacement method. The results provided reliable basis and foundation for the clinical application of rHSA and crystal structure study of HSA fusion proteins.

**Keywords:** human serum albumin, purification, crystallization, crystal structure, fusion protein

人血清白蛋白(human serum albumin, HSA), 由 585 个氨基酸残基组成的非糖基化单链蛋白质, 相对分子质量约为 66 500, 等电点为 4.7~4.9, 为血浆中含量最丰富的蛋白质, 约占血浆蛋白总量的 60%, 具有调控血液中的功能蛋白质、脂肪酸、激素、药物和维持血液渗透压功能<sup>[1-2]</sup>。HSA 主要由 18 种氨基酸残基组成, 整个蛋白质分子有 35 个半胱氨酸, 形成 17 个二硫键, 其中 cys34 为惟一游离的半胱氨酸, 位于蛋白质表面, 并有重要的生理作用<sup>[3]</sup>。HSA 的 X-射线结构表明, 其为高度螺旋化的蛋白质, 67% 的氨基酸残基包含在 28 个  $\alpha$  螺旋中<sup>[4]</sup>。在临床上 HSA 可用于治疗休克与烧伤, 用于补充因手术意外事故或大出血所致的血液丢失, 也可以作为血浆扩容剂<sup>[5-6]</sup>。HSA 在国内外有着巨大的市场需求, 目前市场上的 HSA 主要来源于人血浆(plasma HSA, pHSA), 容易受到病毒等微生物污染及来源有限等原因, 国际上以重组人血清白蛋白(recombinant HSA, rHSA) 替代血源产品的应用已成为趋势<sup>[7]</sup>。近 20 年来, 国内外很多实验室和公司已经开始尝试基因工程方法制备 rHSA, 至今已成功在真菌、细菌、动物以及植物中表达<sup>[8-11]</sup>, 目前的研究集中于用细胞外分泌型的毕赤酵母发酵法制备 rHSA<sup>[12]</sup>。

近年来 HSA 还被广泛用于药用辅料及与小分子药物蛋白融合以提高小分子药物的半衰期<sup>[13]</sup>, HSA 及其复合物的晶体结构研究亦已成为热点<sup>[14-16]</sup>, 而与小分子药物蛋白的融合蛋白的晶体结构研究尚未报道, 作者主要研究毕赤酵母来源的 rHSA 的制备、结晶及初步结构分析, 为 rHSA 在临床上的应用和小分子药物蛋白与白蛋白融合蛋白的晶体结构研究提供可靠的依据和基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 试剂** 所用填料: 购自 GE 公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒: 购自 Thermo Fisher 公司; 酵母粉、蛋白胨、无氨基酸酵母氮源(YNB): 购自上海生工生物工程技术服务有限公司; 蛋白质结晶条件筛选试剂盒: 购自 Hampton 和 Emerald Biosystems 公司; 优化晶体生长用试剂: 购自 Sigma 公司。

**1.1.2 仪器** 50 L 发酵罐: 上海宝兴生物设备工程有限公司产品; Himac CR22G II 高速冷冻离心机: 日本 Hitachi(日立)公司产品; Akta FPLC 系统: 美国 GE; Biorad 电泳系统: 美国伯乐; HPLC 及检测系统: 安捷伦 1100 系列; Leica DFC295 光学显微镜。

**1.1.3 菌种** 毕赤酵母工程菌 *Pichia pastoris* GS115/pPIC9K-rHSA: 由江南大学药学院分子药理研究室构建保存。

### 1.2 方法

**1.2.1 重组菌的发酵表达** 将-80 °C 保藏的 *Pichia pastoris* GS115/pPIC9K-rHSA 在 YPD 平板上划线, 30 °C 培养 48 h。挑取单菌落接种于装有 100 mL YPD 的 500 mL 三角瓶, 30 °C、200 r/min 培养 24 h 左右, 作为一级种子。将一级种子培养液以 5% 的接种体积分数接种于 1 L BMGY 培养基, 30 °C、200 r/min 培养 24 h 左右, 作为二级种子。将二级种子培养液以 5% 的接种体积分数接种于 20 L BMGY 培养基的 50 L 发酵罐, 30 °C、600 r/min、1 vvm 的通氧量、pH 6.0 发酵培养, 溶氧反弹后恒速流加补料培养基; 溶氧再次反弹后用 1% 的甲醇诱导表达, 诱导温度为 28 °C, 诱导 60 h。

**1.2.2 超滤浓缩** 发酵液经过 8 000 r/min, 30 min 冷冻离心获得上清液, 上清液过 0.22  $\mu$ m 微孔滤

膜,使用 Millipore 超滤仪,截留相对分子质量为 10 000 膜包浓缩 20 倍。

**1.2.3 Blue Sepharose 6 Fast Flow 层析** 平衡液 A: 100 mmol/L NaCl, 25 mmol/L KPB, pH 7.2; 洗脱液 B: 2 mol/L NaCl, 25 mmol/L KPB, pH 7.2。调节样品的电导和 pH, A 液平衡后上样,淋洗平衡后,分别以 30% B, 60% B 和 90% B 梯度洗脱,收集在 280 nm 下蛋白质吸收峰。

**1.2.4 Phenyl Sepharose 6 Fast Flow 层析** 平衡液 A: 1 mol/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 25 mmol/L NaAC, pH 4.6; 洗脱液 B: 25 mmol/L NaAC, pH 4.6。上述样品调电导和 pH 值, A 液平衡后上样,淋洗平衡后,分别以 40% B 和 100% B 梯度洗脱,收集在 280 nm 下蛋白质吸收峰。

**1.2.5 SP Sepharose 6 Fast Flow 层析** 平衡液 A: 100 mmol/L NaCl, 50 mmol/L NaAC, pH 4.6; 洗脱液 B: 1 mol/L NaCl, 50 mmol/L NaAC, pH 4.6。上述样品调电导和 pH, A 液平衡后上样,淋洗平衡后,分别以 15% B 和 30% B 梯度洗脱,收集在 280 nm 下蛋白质吸收峰。

**1.2.6 超滤浓缩** 用 millipore 50 mL 相对分子质量 10 000 的超滤离心管, 4 000 r/min 超滤浓缩,后置换缓冲液,最终 rHSA 样品保存在 150 mmol/L NaCl, 25 mmol/L Tris pH 7.2 的养晶缓冲液中,分装,冻存于  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 。

**1.2.7 蛋白浓度计算和纯度分析** 采用 BCA 试剂盒测定蛋白质浓度,用 HPLC 分析检测 rHSA 的纯度,采用 Agilent 1100 液相色谱系统。色谱条件:色谱柱为 DELTA PAK 5F C18 300 Å (3.9 mm×150 mm),流动相为乙腈/水/三氟乙酸(80/20/0.05),体积流量为 0.8 mL/min,SPD-10 AV 紫外检测器,检查波长为 220 nm。对色谱图中所得各峰进行积分,算出主峰峰面积占总面积的百分比即表示样品中 rHSA 的纯度。

**1.2.8 rHSA 样品稳定性分析** rHSA 样品于室温放置一周,后分别加 DTT 和不加 DTT 进行 SDS-PAGE。

**1.2.9 rHSA 蛋白结晶条件筛选、优化及衍射数据收集** 晶体生长条件筛选采取坐滴气相扩散法,使用 Hampton 公司生产的 Crystal Screen、Crystal Screen 2、Index Screen、Crystal Screen Cryo、Crystal Screen Lite、MembFac、Natrix、SaltRx、SaltRx 2、PEG/

Ion Screen、PEG/Ion Screen 2、Quik Screen、Grid Screen Ammonium Sulfate、Grid Screen MPD、Grid Screen Sodium Chloride、Grid Screen Sodium Malonate、Grid Screen PEG 6000 和 Grid Screen PEG/LiCl 试剂盒及 Emerald Biosystems 公司生产的 Wizard™ I matrix macromolecule screen、Wizard™ II matrix macromolecule screen、Wizard™ III matrix macromolecule screen、Wizard™ IV matrix macromolecule screen、Cryo™ I matrix macromolecule screen 及 Cryo™ II matrix macromolecule screen 试剂盒共 1 036 个条件进行筛选,采用 Hampton 公司生产的 24 孔坐滴结晶板,池液 300  $\mu\text{L}$ ,蛋白液与池液比例为 1:1,于  $22\text{ }^\circ\text{C}$  恒温养晶室养晶,每 48 小时观察一次。在初筛筛选出的条件基础上,通过改变沉淀剂浓度、缓冲液及缓冲液的 pH、蛋白质浓度并结合 PEG kit 及 Additive 试剂盒进行优化。晶体在台湾新竹同步辐射中心进行 x 射线衍射及数据的收集和初步处理。

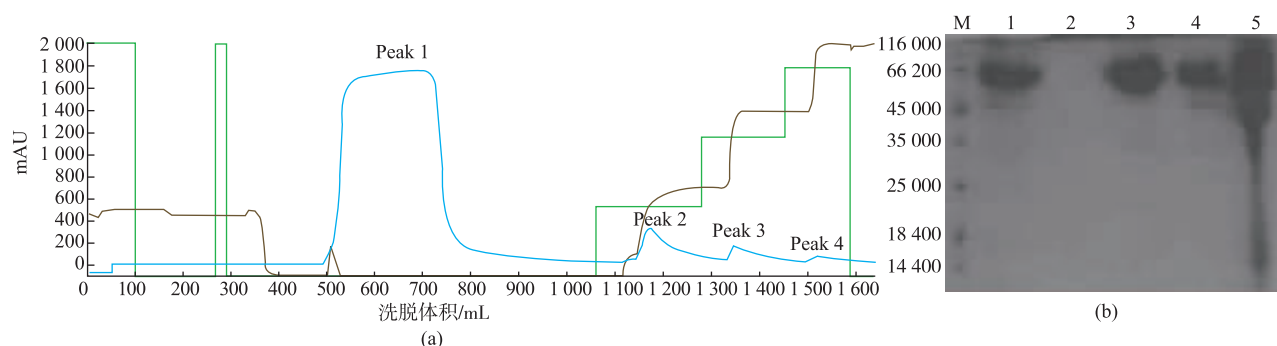
## 2 结果与讨论

### 2.1 Blue Sepharose 6 Fast Flow 层析

Blue Sepharose 6 Fast Flow 是一种染料亲和层析填料,由于其与白蛋白具有一定的亲和能力,并且还存在一定的离子交换能力,从而将杂蛋白质与目的蛋白质分离。100 mmol/L NaCl, 25 mmol/L KPB pH 7.2 的平衡缓冲液平衡后,样品能很好的吸附于 Blue Sepharose 6 FF 上,流穿峰 1 溶液的颜色为黄色,没有检测出目标蛋白质,用 30% B 洗脱得到目的蛋白质峰(图 1(a)中的峰 2),60% B 和 90% B 洗脱得到杂蛋白峰(图 1(a)中的峰 3 和 4)。

### 2.2 Phenyl Sepharose 6 Fast Flow 层析

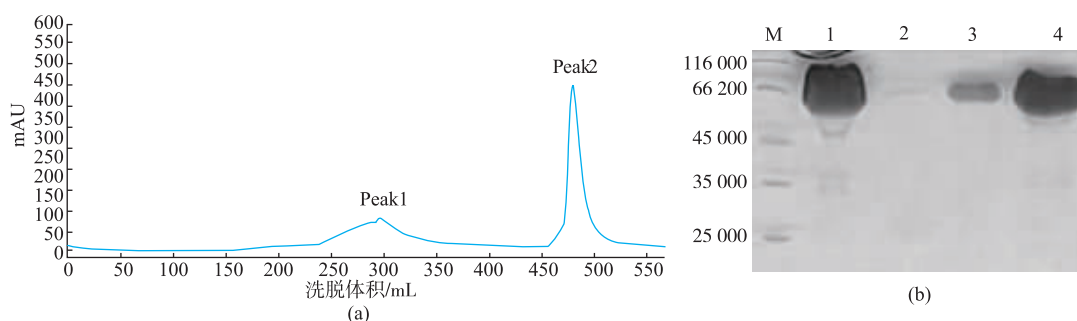
从 Blue Sepharose affinity chromatography 收集得到的样品,含有较高浓度的盐,经 Phenyl Sepharose hydrophobic chromatography 可以达到除盐的效果,以备 SP Sepharose ion-exchange chromatography 的进一步纯化。另外,Blue Sepharose affinity chromatography 收集得到的样品仍然含有部分色素,收集到的样品为淡黄色 Phenyl Sepharose hydrophobic chromatography 可以达到除色素的效果。40% B 洗脱峰(图 2(a)中的峰 2)收集到溶液的颜色为淡黄色,100% B 洗脱得到目的蛋白峰(图 2(a)中的峰 2)。



M: 标准相对分子质量蛋白质; 1: 原样; 2: 平衡缓冲液洗脱峰 (A: peak 1); 3: 30% B 液洗脱峰 (A: peak 2); 4: 60% B 液洗脱峰 (A: peak 3); 5: 90% B 液洗脱峰 (A: peak 4)

图 1 rHSA 的 Blue 亲和层析纯化及鉴定

Fig. 1 Purification of rHSA by Blue sepharose dye affinity chromatography and identification



M: 标准相对分子质量蛋白质; 1: Blue 染料亲和层析 30%B 液洗脱液; 2: 苯基疏水层析平衡缓冲液洗脱峰; 3: 苯基疏水层析 40% B 液洗脱峰 (A: peak 1); 4: 苯基疏水层析 100%B 液洗脱峰 (A: peak 2)

图 2 rHSA 的 Phenyl 疏水层析及鉴定

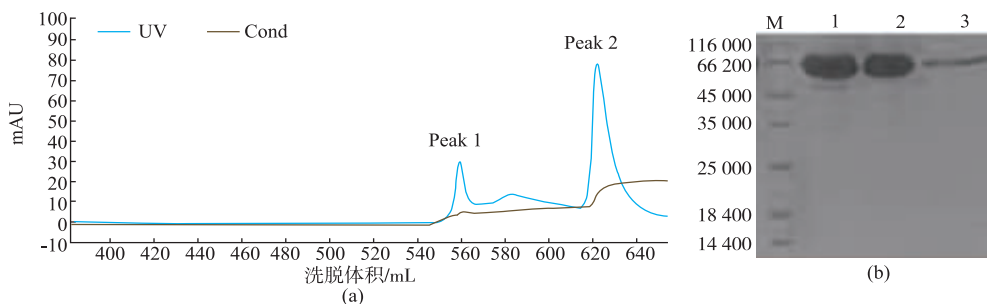
Fig. 2 Purification of rHSA by Phenyl Sepharose hydrophobic chromatography and identification

### 2.3 SP Sepharose 6 Fast Flow 层析

从 Phenyl Sepharose hydrophobic chromatography 收集得到的样品仍然含有少量的杂蛋白质, 经 SP Sepharose ion-exchange chromatography 可以较好地除去该杂蛋白质, 得到高纯度的 rHSA。15% B 洗脱得到杂蛋白质峰 (图 3(a) 中的峰 1), 30% B 洗脱得到目的蛋白质峰 (图 3(a) 中的峰 2)。

### 2.4 rHSA 纯度分析

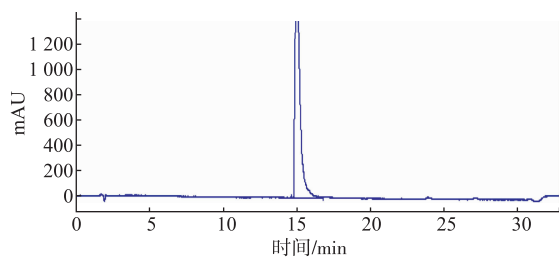
最终得到的样品纯度采用 SDS-PAGE 和 HPLC 两种方法检测, SDS-PAGE 检测纯化后的 rHSA 为一条带 (图 3b), HPLC 分析仅有一个峰, 可以说明 rHSA 的纯度可达 99.9% 以上, 见图 4。表明发酵液中的 rHSA 采用上述分离方法进行纯化取得了非常理想的分离效果, 符合进一步结晶要求。



M: 标准分子量蛋白质; 1: 苯基疏水层析 100%B 液洗脱液; 2: SP 离子交换层析 30% B 液洗脱峰 (A: peak 2); 3: SP 离子交换层析 15% B 液洗脱峰 (A: peak 1)

图 3 rHSA 的 SP 离子交换纯化及鉴定

Fig. 3 Purification of rHSA by SP Sepharose ion-exchange chromatography and identification



Peak	Ret Time/ min	Type	Width/min	Area/ (mAU*s)	Area/%
1	15.033	PB	0.371 1	3.825 8e4	100

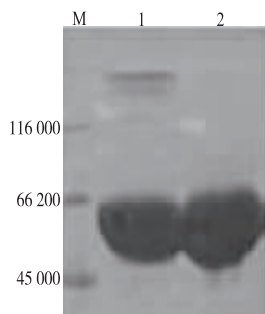
图4 rHSA的HPLC纯度鉴定

Fig. 4 Purity identification of rHSA by HPLC

## 2.5 rHSA 样品稳定性分析

因为蛋白质结晶对蛋白样品的纯度要求较高,且需要一定的时间,所以对蛋白质样品的稳定性有一定的要求。rHSA 有一个游离的半胱氨酸,且位于表面,故较易形成二聚体。

从 SDS-PAGE(见图 5)知,rHSA 较易形成二聚体及多聚体,而加入 DTT 后可使多聚形态的 rHSA 变为单体形态,故养晶时 rHSA 的缓冲液中需加入 10 mmol/L DTT 维持其单体形态。



M: 标准相对分子质量蛋白质;1: 未加 DTT 的 rHSA 样品;2: 加 DTT 的 rHSA 样品

图5 有 DTT 和无 DTT 条件下 rHSA 的 SDS-PAGE

Fig. 5 SDS-PAGE of rHSA with/without DTT

## 2.6 rHSA 结晶条件筛选

经两周观察,1 036 个条件均没有蛋白晶体生长,且有一反常现象,即随着时间的延长,沉淀条件增多,最终有 3/4 以上的条件形成沉淀,初步分析,引起沉淀的原因可能为:温度、色素和 DTT。

**2.6.1 温度** 因实验时间为夏季,实验环境温度由中央空调控制,夜间会关闭,导致昼夜温差较大,温度变化可能会引起沉淀。采取措施:独立安装空调,温度恒定控制,重新筛选结晶条件。经两周时间观察,仍然没有蛋白晶体生长,沉淀现象没有改善,得

出沉淀不是温度变化引起的。

**2.6.2 色素** 毕赤酵母发酵表达时会产生大量色素,而纯化后用于养晶的 rHSA 质量浓度为 100 mg/mL 时为淡黄色,可能是色素未完全除去,从而引起沉淀。

1) CM Sepharose Fast Flow 层析除色素:因 rHSA 有较多的结合位点,可能部分色素与 rHSA 结合,导致经多步纯化后色素仍未完全除去。而文献[4]报道,HSA 在 pH 低于 2.7 时,为 extended conformation;pH 介于 2.7~4.3 时与生理条件相比,失去部分  $\alpha$ -helix;在 pH 为 4.3~8.0 时,与生理条件相同;在 pH 高于 8.0 时,失去了部分  $\alpha$ -helix,反而增加与一些配体的结合力。假如部分色素是与 HSA 结合的,可以考虑使 rHSA 处于不同的 pH 条件,从而破坏色素与其结合位点而除去色素。

于是使 rHSA 分别置于 pH 2.5 和 pH 3.6 的缓冲溶液中,后过 CM 柱,根据不同 pH 洗脱,最终保存在 pH 7.2 的缓冲液中,4  $^{\circ}$ C 过夜复性。浓缩至 100 mg/mL,最终颜色比之前淡多了,但仍有一些淡黄色,rHSA 最初置于 pH 2.5 和 pH 3.6 的缓冲溶液中差别不明显。重新筛选结晶条件,分别养晶。

经两周时间观察,仍然无蛋白晶体生长,沉淀现象没有改善,但仍无法判断沉淀是否是色素引起的。

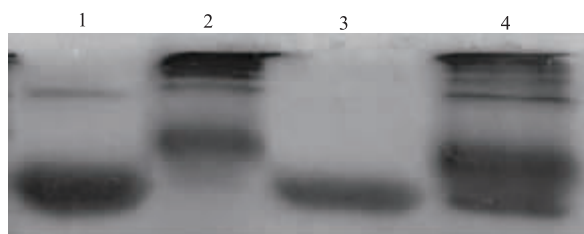
2) 低温乙醇沉淀法除色素:因 2010 版《中国药典》记录血浆来源的 HSA 的生产过程有低温乙醇沉淀,血液成分比较复杂,也含有色素,尝试低温乙醇沉淀,根据色素的有机性,利用相似相溶的原理可能除去色素。调 pH 5.0,分别使用 30%和 50%低温乙醇沉淀。复溶至 100 mg/mL 时,50%复溶样品无色,选用 50%乙醇沉淀样品筛选结晶条件。经两周时间观察,仍然没有蛋白晶体生长,沉淀现象没有明显改善,可以得出沉淀并不是色素引起的。

**2.6.3 DTT** DTT 为一种还原剂,筛 rHSA 的结晶条件时为维持其单体状态加入了 10 mmol/L DTT,而 rHSA 自身有 17 个二硫键,是否因为 DTT 的加入破坏了 rHSA 分子的二硫键,进一步导致 rHSA 的沉淀。

从 Native PAGE(图 6)知,DTT 确实破坏的 rHSA 分子的二硫键,导致其构象变化,从而得出:沉淀现象是由 DTT 引起的,因 DTT 的加入破坏了 rHSA 分子的二硫键,从而暴露出更多游离的半胱

氨酸,打破部分二硫键后的 rHSA 分子由于相互碰撞,从而形成二聚体、多聚体,进一步形成沉淀。

另外 rHSA 在 KPB Buffer 中比 Tris Buffer 中稳定,rHSA 在 Tris Buffer 中会形成少量二聚体。所以更换 rHSA 样品所处的缓冲重新筛选结晶条件。最终筛选出的 rHSA 的结晶条件见表 1。



1:未加 DTT 的 rHSA Tris 缓冲溶液;2:加 DTT 的 rHSA Tris 缓冲溶液;3:未加 DTT 的 rHSA 磷酸钾缓冲溶液;4:加 DTT 的 rHSA 磷酸钾缓冲溶液

图 6 有 DTT 和无 DTT 条件下 rHSA 在 Tris 和 KPB 缓冲液中的 Native PAGE

Fig. 6 Native PAGE of rHSA in tris buffer and KPB buffer with/without DTT

表 1 rHSA 的结晶条件

Table 1 Crystallization condition of rHSA

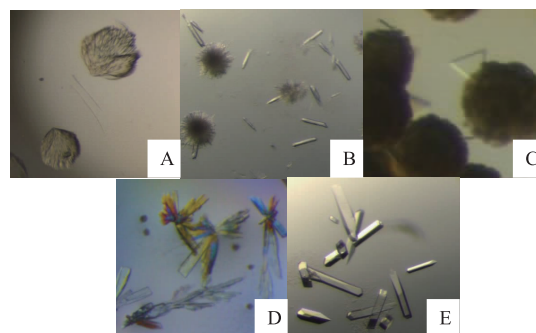
试剂盒	条件	晶型	时间
Crystal Screen	条件 43:30 g/dL PEG 1500	单晶,长棒状,棱角不分明	2 d
Index	条件 45:0.1 mol/L Tris pH 8.5,25 g/dL PEG 3350	团簇型,有薄片状,有针状	5~7 d
Index	条件 46:0.1 mol/L Bis-Tris pH 6.5,20 g/dL MPEG 5000	单晶,三角片状	5 d
Index	条件 47:0.1 mol/L Bis-Tris pH 6.5,28 g/dL MPEG 2000	单晶,棒状	3~5 d
Grid Screen PEG 6000	条件 B6:0.1 mol/L BICINE pH 9.0,10 g/dL PEG 6000	球晶	3~5 d

## 2.7 结晶条件优化及衍射数据收集

**2.7.1 优化结果** rHSA 的结晶条件优化结果见图 7。

**2.7.2 衍射数据收集** 沉淀剂为 PEG 6000 条件优化由于得不到单晶,无法进行 X ray 衍射。沉淀剂为 PEG 1500 条件优化得到的单晶较脆弱,无法捞取完整晶体。沉淀剂为 MPEG 5000 条件优化得到的单晶分辨率很差,低于 8.0 Å。沉淀剂为 PEG 3350 条件优化得到的晶体分辨率较差,低于 4.0 Å。沉淀剂为 MPEG 2000 条件下优化得到的单晶分辨率一

般,为 3.4 Å。沉淀剂为 MPEG 2000 条件下优化得到 pHSA 单晶并获得分辨率为 3.1 Å 的数据。



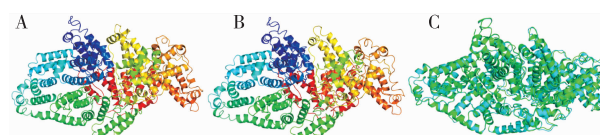
A:0.1 mol/L Tris pH 8.0,12 g/dL PEG 6000;B:0.1 mol/L Tris pH 8.0,26 g/dL PEG 1500;C:0.1 mol/L Bis-Tris pH 6.5,17.5 g/dL MPEG 5000;D:50 mmol/L KPB pH 7.5,30 g/dL PEG 3350;E:50 mmol/L KPB pH 7.5,29.5 g/dL MPEG 2000

图 7 不同条件下 rHSA 优化后的晶体形态

Fig. 7 Optimized crystals of rHSA from different condition

## 2.8 晶体结构解析

rHSA 和 pHSA 都是由 α 螺旋构成的二聚体,其中单体为三个结构域组成的心形结构,与文献报道的一致,通过结构比对知二者的折叠大体一致。



rHSA-绿色,pHSA-蓝色

A:rHSA 结构;B:pHSA 结构;C:rHSA 与 pHSA 的结构比对

图 8 rHSA 和 pHSA 的晶体结构及结构比对

Fig. 8 Crystal structure and structure alignment of rHSA and pHSA

## 3 结语

通过毕赤酵母系统表达,获得重组人血清白蛋白,依次通过超滤浓缩,Blue 亲和和层析,Phenyl 疏水层析和 SP 离子交换层析得到高纯度的 rHSA。通过结晶条件筛选实验得出 rHSA 养晶时所处的条件不能含有类似 DTT 的强还原剂,且筛选出沉淀剂分别为 PEG 1500,PEG 3350,PEG 6000,MPEG 5000 和 MPEG 2000 五种结晶条件,沉淀剂均为有机试剂,得出 rHSA 的结晶环境为疏水环境。而 HSA 融合蛋白的主体仍为白蛋白,所以 HSA 融合蛋白的结晶环

境应为疏水环境,对今后 HSA 融合蛋白的结晶条件筛选具有指导性意义,在此基础上,在沉淀剂为 MPEG 2000 的疏水环境下亦获得了 rHSA-IFN $\alpha$ 2b 的晶体。

作者成功获得了 rHSA 的单晶,在沉淀剂为 MPEG 2000 的条件下获得了分辨率为 3.4 Å 的数据,另外作者在沉淀剂为 MPEG 2000 的条件下亦得到 pHSA 的单晶,获得分辨率为 3.1 Å 的数据,分

辨率均不是很高,原因一方面可能为光源强度不足,另一方面可能由于 HSA 相对分子质量较大,从而 HSA 晶体的晶格较大,造成 HSA 晶体内部分子堆积时不易规则。通过分子置换法得到 rHSA 和 pHSA 的晶体结构,经对比知二者的结构基本相似,为今后毕赤酵母系统来源的 rHSA 替代 pHSA 及 rHSA 的进一步晶体结构研究提供理论依据。

## 参考文献:

- [1] Meloun B, Moravek L, Knstka V. Complete amino acid sequence of human serum albumin[J]. **FEBS Lett**, 1975, 58(1):134-137.
- [2] Mendez C M, McClain C J, Marsano L S. Albumin therapy in clinical practice[J]. **Nutr Clin Pract**, 2005, 20(3):314-320.
- [3] Grigoryan H, Li H, Iavarone A T, et al. Cys34 adducts of reactive oxygen species in human serum albumin [J]. **Chemical Research in Toxicology**, 2012, 25(8):1633-1642.
- [4] Fanali G, di Masi A, Trezza V, et al. Human serum albumin: From bench to bedside [J]. **Molecular Aspects of Medicine**, 2012, 33(3):209-290.
- [5] Alexander M R, Ambre J J, Liskow B I, et al. Therapeutic use of albumin[J]. **JAMA**, 1979, 241(23):2527-2529.
- [6] Hastings G E, Wolf P G. The therapeutic use of albumin[J]. **Arch Fam Med**, 1992, 1(2):281-287.
- [7] Merten O W. Virus contaminations of cell cultures—a biotechnological view[J]. **Cytotechnology**, 2002, 39(2):91-116.
- [8] Lawn R M, Adelman J, Beck S C, et al. The sequence of human serum albumin cDNA and its expression in *E.coli* [J]. **Nucleic Acids Research**, 1981, 9(22):6103-6114.
- [9] Carter D C, He X M, Munson S H, et al. Three-dimensional structure of Human serum albumin [J]. **Science**, 1989, 244:1195-1198.
- [10] Itamar B, Alexander F, Ariela B, et al. Synthesis and secretion of human serum albumin by mammary gland explants of virgin and lactating transgenic mice[J]. **Transgenic Research**, 1993, 2(5):266-276.
- [11] Yang H, Tingting N, Tingting X, et al. Large-scale production of functional human serum albumin from transgenic rice seeds[J]. **PNAS**, 2011, 108(47):19078-19083.
- [12] Kaoru K. Summary of recombinant human serum albumin development[J]. **Biologicals**, 2006, 34(1):55-59.
- [13] 石屹峰, 边蕾. 以人血清白蛋白为载体的长效蛋白质药物的研究进展[J]. **中国医药生物技术**, 2008, 3(6):454-456.  
SHI Yifeng, BIAN Lei. Research advances in improving the pharmacokinetics of protein drugs by utilizing human serum albumin as a carrier[J]. **Chin Med Biotechnol**, 2008, 3(6):454-456. (in Chinese)
- [14] Zhu L, Yang F, Chen L, et al. A new drug binding subsite on human serum albumin and drug-drug interaction studied by X-ray crystallography[J]. **Journal of Structural Biology**, 2008, 162(1):40-49.
- [15] Patricia A Z, Jamie G, Teruyuki K, et al. Crystal structural analysis of human serum albumin complexed with heme and fatty acid [J]. **BMC Structural Biology**, 2003, 3(1):1-9.
- [16] Ananyo A, Bhattacharya, Stephen C, et al. Binding of the general anesthetics propofol and halothane to human serum albumin[J]. **The Journal of Biological Chemistry**, 2000, 275(49):38731-38738.