



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107383185 A

(43)申请公布日 2017. 11. 24

(21)申请号 201710638162.1

(22)申请日 2017.07.31

(71)申请人 天津市正江现代生物技术有限公司

地址 300000 天津市北辰区经济开发区内  
双原道12号

(72)发明人 陈燕

(51) Int. Cl.

C07K 14/765(2006.01)

C07K 1/14(2006.01)

C07K 1/18(2006.01)

权利要求书1页 说明书2页

(54)发明名称

一种高纯度牛血清白蛋白的提取方法

(57)摘要

本发明提供了一种高纯度牛血清白蛋白的提取方法,其包括,离心分离牛血清溶液,加热提取牛血清白蛋白,第一次透析纯化,第二次阴离子交换层析纯化,最后进行脱盐浓缩,过滤除菌。本发明工艺流程短,操作简单,生产效率高,且本发明中无有机溶剂的使用,避免了蛋白发生聚集或变性,同时可减少对环境的污染和生产过程中的不安全因素,提高了产品纯度,使其能够广泛地应用医疗、生化等领域。

1. 一种高纯度牛血清白蛋白的提取方法,其特征在于:包括以下步骤:

(1) 取新鲜牛血,加入原血清体积10%抗凝剂,经检验检疫合格后,在4℃下2500rpm离心10min,取上清于-20℃冷冻,取冷冻的血清,室温下充分融化后,10000rpm离心10min,取上清即为牛血清;

(2) 取所述牛血清于反应釜中,加入生理盐水稀释,加入稳定剂,再加入1mol/L的盐酸将溶液pH值调至5.1~5.2,水浴加热,使反应釜内溶液的温度保持在65~75℃,反应持续60~80min,过滤后,收集滤液;

(3) 取所述滤液,用0.02mol/L的Tris-HCl缓冲溶液于4℃透析,透析袋截留分子量为20000;

(4) 取透析过后的组分液,使用阴离子交换层析进一步纯化,使用0.2mol/L浓度氯化钠进行梯度洗脱;

(5) 收集洗脱组分,并且进行脱盐浓缩,浓缩后的洗脱液使用过滤器进行过滤除菌,过滤孔径为0.1um;

(6) 将除菌过滤后的溶液进行冷冻干燥,即得到牛血清白蛋白冻干粉。

2. 根据权利要求1所述的一种高纯度牛血清白蛋白的提取方法,其特征在于:步骤(1)中所述抗凝剂为4%的柠檬酸钠溶液。

3. 根据权利要求1所述的一种高纯度牛血清白蛋白的提取方法,其特征在于:所述步骤(2)中生理盐水与牛血清的体积比为1:2。

4. 根据权利要求1所述的一种高纯度牛血清白蛋白的提取方法,其特征在于:所述步骤(2)中的稳定剂为软脂酸钠。

5. 根据权利要求1所述的一种高纯度牛血清白蛋白的提取方法,其特征在于:所述步骤(2)中稳定剂按每100ml牛血清中加入0.7g的量加入。

6. 根据权利要求1所述的一种高纯度牛血清白蛋白的提取方法,其特征在于:所述步骤(4)中阴离子交换层析的填料为DEAE—纤维素。

## 一种高纯度牛血清白蛋白的提取方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及蛋白纯化技术领域,尤其涉及一种高纯度的牛血清白蛋白提取方法。

### 背景技术

[0002] 蛋白质是生命的物质基础,血清白蛋白是血浆中含量最丰富的蛋白质,它能与许多内源及外源性化合物相结合,起到存储与转化的作用。在动物细胞无血清培养中,添加白蛋白可起到生理和机械保护作用 and 载体作用。牛血清白蛋白(BSA),又称第五组分,是牛血清中的一种球蛋白,包含583个氨基酸残基,分子量为66.43kDa,等电点为4.7,是生物学、医学、药学等领域中广泛应用的生化试剂。

[0003] 在现阶段,牛血清白蛋白的提取主要有以下三种方法。盐析法用硫酸铵分级沉淀后,经辛酸处理精制而得,此方法为最传统的生产方法,但其工艺繁琐,生产效率不高;有机溶剂沉淀法是利用乙醇的低介电常数性质以及蛋白质在一定温度、pH、离子强度及浓度条件下在不同浓度乙醇中的溶解度不同,从而实现血浆蛋白质的分离,此法可以生产出多种血浆蛋白,但是蛋白的纯度不高;热激法是取牛血用枸橼酸钠抗凝离心后得到血浆,加热,加入辛酸钠,调pH值后加乙醇,再经过多级处理后得到牛血清白蛋白,此方法血清白蛋白中会残留部分化学试剂,导致牛血清白蛋白的纯度较低。

### 发明内容

[0004] 为解决现有技术问题,本发明提供一种高纯度的牛血清白蛋白的提取方法。

[0005] 为实现上述目的,本发明是通过以下技术方案实现的:

[0006] 一种高纯度牛血清白蛋白的提取方法,包括以下步骤:

[0007] (1) 取新鲜牛血,加入原血量体积10%抗凝剂,经检验检疫合格后,在4℃下2500rpm离心10min,取上清于-20℃冷冻,取冷冻的血清,室温下充分融化后,10000rpm离心10min,取上清即为牛血清;

[0008] (2) 取所述牛血清于反应釜中,加入生理盐水稀释,加入稳定剂,再加入1mol/L的盐酸将溶液pH值调至5.1~5.2,水浴加热,使反应釜内溶液的温度保持在65~75℃,反应持续60~80min,过滤后,收集滤液;

[0009] (3) 取所述滤液,用0.02mol/L的Tris-HCl缓冲溶液于4℃透析,透析袋截留分子量为20000;

[0010] (4) 取透析过后的组分流,使用阴离子交换层析进一步纯化,使用0.2mol/L浓度氯化钠进行梯度洗脱;

[0011] (5) 收集洗脱组分,并且进行脱盐浓缩,浓缩后的洗脱液使用过滤器进行过滤除菌,过滤孔径为0.1μm;

[0012] (6) 将除菌过滤后的溶液进行冷冻干燥,即得到牛血清白蛋白冻干粉。

[0013] 优选的,所述抗凝剂为4%的柠檬酸钠溶液。

[0014] 优选的,所述生理盐水与牛血清的体积比为1:2。

[0015] 优选的,所述稳定剂为软脂酸钠。

[0016] 优选的,所述稳定剂按每100ml牛血清中加入0.7g的量加入。

[0017] 优选的,所述阴离子交换层析的填料为DEAE—纤维素。

[0018] 与传统技术相比,本发明的有益效果如下:

[0019] 本发明工艺流程短,操作简单,生产效率高,且本发明中无有机溶剂的使用,避免了蛋白发生聚集或变性,同时可减少对环境的污染和生产过程中的不安全因素,提高了产品纯度,使其能够广泛地应用医疗、生化等领域。

### 具体实施方式

[0020] 下面结合实施例对本发明进一步说明。

[0021] 实施例

[0022] 一种高纯度牛血清白蛋白的提取方法,包括以下步骤:

[0023] (1) 取新鲜牛血,加入原血量体积10%且浓度为4%的抗凝剂柠檬酸钠,经检验检疫合格后,在4℃下2500rpm离心10min,取上清于-20℃冷冻,取冷冻的血清,室温下充分融化后,10000rpm离心10min,取上清即为牛血清;

[0024] (2) 取所述牛血清于反应釜中,加入生理盐水稀释至原血清的2倍,按每100ml牛血清中加入0.7g的量加入稳定剂软脂肪酸钠,再加入1mol/L的盐酸将溶液pH值调至5.1,水浴加热,使反应釜内溶液的温度保持在70℃,反应持续60min,过滤后,收集滤液;

[0025] (3) 取所述滤液,用0.02mol/L的Tris-HCl缓冲溶液于4℃透析,透析袋截留分子量为20000;

[0026] (4) 取透析过后的组分流,使用DEAE—纤维素交换层析进一步纯化,使用0.2mol/L浓度氯化钠进行梯度洗脱;

[0027] (5) 收集洗脱组分,并且进行脱盐浓缩,浓缩后的洗脱液使用过滤器进行过滤除菌,过滤孔径为0.1um;

[0028] (6) 将除菌过滤后的溶液进行冷冻干燥,即得到牛血清白蛋白冻干粉。

[0029] 以上所述仅为本发明的优选实施例而已,并不用于限制本发明,对于本领域的技术人员来说,本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。