(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 103709246 A
(43)申请公布日 2014.04.09

(21)申请号 201310602964.9

(22)申请日 2013.11.25

(71)申请人 北京济福霖生物技术有限公司
地址 100193 北京市海淀区马连洼北路 158 号众鼎大厦 306 室

(72)发明人 赵建敏 王建武 王慧敏 李由 付明波 汤波 李宁

(74)专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002
代理人 王文君

(51)Int.Cl.
*C07K 14/79*(2006.01)
*C07K 1/18*(2006.01)
*C07K 1/20*(2006.01)
*C12N 9/08*(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页 附图3页

(54)发明名称

一种乳铁蛋白及乳过氧化物酶的纯化方法

(57)摘要

本发明提供了一种重组人乳铁蛋白、动物源乳铁蛋白及乳过氧化物酶的纯化方法，其是以含有重组人乳铁蛋白的乳样为原料，通过预处理得到脱脂乳，再将所获得的脱脂乳进行阳离子交换层析分离，然后分别在不同盐浓度条件下将乳铁蛋白与乳过氧化物酶洗脱分离，得到高纯度的乳铁蛋白及乳过氧化物酶，进一步将富含乳铁蛋白的溶液通过疏水互作色谱分离分别得到纯度≥99%的重组人乳铁蛋白与动物源乳铁蛋白。利用本发明所述的纯化方法得到的重组人乳铁蛋白的纯度≥99%，且重组人乳铁蛋白具有和天然人乳铁蛋白相似的理化活性和生理功能，而且整个工艺为一步纯化过程，因此成本低廉、简便，适用于工业化大规模生产。

CN 103709246 A

1. 一种乳铁蛋白及乳过氧化物酶的纯化方法，其特征在于，其是以含有重组人乳铁蛋白的乳样为原料，通过预处理得到脱脂乳，再将所获得的脱脂乳进行阳离子交换层析分离，并去除内毒素，然后分别在不同盐浓度条件下将乳铁蛋白与乳过氧化物酶洗脱分离，得到高纯度的乳铁蛋白及乳过氧化物酶，进一步通过疏水互作色谱将重组人乳铁蛋白与动物内源乳铁蛋白分离，最后对纯化的蛋白纯品进行浓缩脱盐。

2. 根据权利要求 1 所述的纯化方法，其特征在于，所述预处理为通过蝶式离心机进行脱脂，再利用 0.14μm ～ 1.4μm 膜技术进行除菌，得到无菌脱脂乳。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的纯化方法，其特征在于，所述阳离子交换层析的阳离子交换树脂的粒径大小范围为 90μm ～ 300μm，线性流速为 50cm/h ～ 300cm/h，而后通过疏水互作色谱疏水互作色谱进行分离纯化，配基密度范围为 20 ～ 50μmol，线性流速为 50cm/h ～ 100cm/h。

4. 根据权利要求 3 所述的纯化方法，其特征在于，所述阳离子交换层析为在 1 ～ 10mM EDTA，2 ～ 6ms/cm，pH5 ～ 7.5 的磷酸盐缓冲液平衡离子交换层析柱上样后，用 8 ～ 15ms/cm 的 NaCl 或 KCl 缓冲液洗脱乳过氧化物酶，用 170ms/cm 以下的 NaCl 或 KCl 缓冲液单独洗脱乳铁蛋白。

5. 根据权利要求 4 所述的纯化方法，其特征在于，所述阳离子交换层析为在 2 ～ 6ms/cm，pH5 ～ 7.5 的磷酸盐缓冲液平衡离子交换层析柱上样后，用 9 ～ 15ms/cm 的 NaCl 或 KCl 缓冲液中洗脱乳过氧化物酶，使用 126ms/cm 的 NaCl 或 KCl 缓冲液单独洗脱乳铁蛋白。

6. 根据权利要求 1 所述的纯化方法，其特征在于，所述的疏水互作色谱为上样到电导 100-160ms/cm 的硫酸铵，20-50mM，pH6.5-7.5 磷酸盐缓冲液平衡的疏水互作层析柱，包括 Phenyl、Butyl 和 Octyl 所有不同基质的疏水介质，优化 Phenyl，流速为 78-160cm/h，而后使用电导为 50-70ms/cm 的硫酸铵 +20-50mM，pH6.5-7.5 磷酸盐缓冲液单一洗脱重组人乳铁蛋白，使用电导为 6ms/cm 以下的 20-50mM，磷酸盐缓冲液单一洗脱动物内源乳铁蛋白。

7. 根据权利要求 1 所述的纯化方法，其特征在于，所述去除内毒素为采用浓度为 0.1% ～ 2% 的非离子去污剂与浓度为 1mM ～ 10mM 的金属络合剂相结合去除乳铁蛋白纯品中的内毒素。

8. 根据权利要求 1 所述的纯化方法，其特征在于，所述蛋白浓缩脱盐为将纯化得到的乳铁蛋白与乳过氧化物酶使用 50kD 以下的膜进行蛋白质浓缩脱盐。

9. 利用权利要求 1-8 任一项所述的纯化方法得到的乳铁蛋白在抗菌产品生产中的应用。

10. 利用权利要求 1-8 任一项所述的纯化方法得到的乳过氧化物酶在抗氧化产品生产中的应用。

# 一种乳铁蛋白及乳过氧化物酶的纯化方法

## 技术领域

[0001] 本发明涉及蛋白质纯化，具体地说，涉及一种乳铁蛋白及乳过氧化物酶的纯化方法。

## 背景技术

[0002] 乳铁蛋白(Lactoferrin，LF)是一种非血红素铁结合蛋白，是转铁蛋白家族的一员，它与血清转铁蛋白、卵铁传递蛋白等均有将铁元素传递到血清的功能。除此以外，乳铁蛋白还具以下重要生理功能：(1)参与机体铁代谢，促进铁的吸收和利用，提高铁剂生物药的效果并减少其副作用，预防和治疗缺铁所导致的贫血性疾病；(2)广谱的抗细菌活性和抗病毒活性；(3)改善胃肠道功能，促进婴幼儿胃肠道发育；(4)抗炎症活性和免疫调节功能；(5)抗氧化功能：乳铁蛋白能通过清除体内过多的铁离子，阻止活性氧自由基形成和机体氧化反应，从而延缓衰老和预防慢性疾病；(6)乳铁蛋白还具有抗肿瘤、同多种抗生素和抗病毒药物协同作用。其中，乳铁蛋白的抗菌活性基于两种机理，第一是它可以剥夺细菌中的铁离子，从而抑制细菌活性；另一个机理是乳铁蛋白直接作用于受感染部位，它所带的正电荷可以与一些细菌、病毒、真菌和寄生虫表面的阴离子分子相互作用，最终导致细胞裂解。

[0003] 人乳铁蛋白(Human Lactoferrin，HLF)是人乳中重要的免疫功能因子，其含量和生物活性均优于其它哺乳动物，因此国内外学者专家对于人乳铁蛋白的研究较多，分别利用转基因技术在不同表达体系中生产重组人乳铁蛋白，如：重组人乳铁蛋白分别在曲霉属真菌、转基因动物、转基因植物中均有表达，但相对而言，转基因动物如奶牛和奶山羊表达的重组人乳铁蛋白的产量和生物活性均优于其它表达系统，可以大规模生产重组人乳铁蛋白，从而开发以其为主要功能成分的能够治疗缺铁性贫血、抗菌、抗骨质疏松和抗肿瘤等药物。

[0004] 乳过氧化物酶(lactoperoxidase，LP)是分泌在乳中的一种氧化还原酶，它具有参与构成宿主对抗入侵微生物的天然防御系统，同时还具有抗菌活性、降解各种致癌物质及保护细胞过氧化的作用。LP 可与过氧化氢、卤化物或类卤化物 (X-、SCN-) 一起构成乳过氧化物酶体系 (LPS)。LP 催化氧化卤化物形成次卤酸，产物次卤酸是一种细胞毒素，能与蛋白质交联，抑制酶和细胞因子的活性，因此 LP 也具有抑菌的功能。

[0005] 目前，分离纯化乳铁蛋白与乳过氧化物酶的方法主要有离子交换色谱法、疏水互作色谱法、亲和色谱法、金属螯合色谱法、羟基磷灰石色谱法和超滤法。由于离子交换色谱具有低成本、耐酸碱、上样体积大、较易精确控制条件，适合放大进行工业化生产，而乳铁蛋白为带有正电荷的碱性蛋白，因此利用离子交换色谱进行分离纯化为首选，虽然离子交换技术有如上许多优点，但即便是用最精确的控制条件，仅用离子交换单一的方法也得不到纯的蛋白，还需要其它的纯化步骤。亲和色谱的特异性最佳、纯度较高、蛋白生物活性没有损失，但由于成本高，因此工业化难度较大。疏水互作色谱需要配置高浓度盐溶液来稀释蛋白溶液，因此可能会产生蛋白质沉淀现象而造成蛋白质的损失，且分辨率差、蛋白纯度较

低。金属螯合色谱的原理是基于蛋白质与固定金属的亲和作用进行分离，且最常用于纯化带有多聚组氨酸标签的蛋白质，因此不适合用于乳铁蛋白的规模性纯化。羟基磷灰石色谱为六棱柱形 HAp 陶瓷构成，可以强力结合天然蛋白，一旦蛋白发生变性，这种结合力迅速降低，所以，在这种支持介质上蛋白质的保留程度不易预测。

[0006] 从乳中分离纯化乳铁蛋白、乳过氧化物酶方法的专利与乳铁蛋白抑菌活性的专利都较多，例如：中国专利申请号为 200710102035.6 的发明专利，公开了一种通过酸沉淀的方法去除酪蛋白得到澄清的乳清，而后利用填料为 SP Sepharose HP 的层析柱分离纯化重组人乳铁蛋白，可看出此方法中使用的层析填料粒径小，将会产生高压，因此限制了流速的范围。中国专利申请号为 200610040528.7 的发明专利，公开了以牛初乳脱脂乳清为原料，采用酶法去除酪蛋白，膜分离技术与工业色谱技术相结合，从牛初乳中分离纯度为 90% 以上的乳铁蛋白，然而此方法较繁琐、成本高。中国专利申请号为 200410016117.5 的发明专利，公开了以牛乳为原料，采用离心方式去除乳脂，利用交错切面流体过滤分离装置去除乳糖和小分子物质，运用阳离子交换色谱吸附乳铁蛋白与乳过氧化物酶，用盐溶液将其洗脱下来，然而此方法适用于实验室规模。美国专利公开号为 US2008227171A1 的发明专利，利用阳离子交换色谱与膜分离技术分离乳过氧化物酶得到蛋白纯度≥ 80%。美国专利公开号为 US5861491A 的发明专利，介绍了利用 Mono S 阳离子交换色谱、疏水互作色谱与亲和色谱对乳铁蛋白进行分离纯化，但由于 Mono S Sepharose 粒径小、亲和色谱成本高、疏水互作色谱收率低，因此上述方法都不适合规模化工业生产。国际专利公开号为 WO03073866A1 的发明专利，描述了从各种来源的乳样中通过酸沉淀或盐沉淀法提取乳铁蛋白，导致蛋白收率较低。美国专利公开号为 US4791193A 的发明专利，描述了以 CM 为吸附基团，通过不同介质骨架对乳铁蛋白进行分离纯化，由于吸附基团 CM 的载量较低，因此样品的上样体积受限。美国专利公开号为 US7060677B1 的发明专利，阐述了人乳铁蛋白中的某些肽段具有较强的抑菌效果。美国专利公开号为 US7375080B1 的发明专利，通过乳铁蛋白的 N 末端将乳铁蛋白固定化到天然基质上抑制微生物生长。

[0007] 由此可见，一些分离纯化技术在实验室规模可以制备高纯度的乳铁蛋白，但处理量小，成本高，难以规模化生产。本发明利用色谱技术一步纯化将原乳样中的重组人乳铁蛋白分离，继而纯化出乳过氧化物酶，达到快速、简便、低成本、大批量生产重组人乳铁蛋白与乳过氧化物酶，提高了生产效率。

## 发明内容

[0008] 本发明的目的是提供一种从含有重组人乳铁蛋白的乳样中，快速、高效分离重组人乳铁蛋白、动物源乳铁蛋白与乳过氧化物酶的方法。

[0009] 为了实现本发明目的，本发明提供一种重组人乳铁蛋白、动物源乳铁蛋白及乳过氧化物酶的纯化方法，其是以含有重组人乳铁蛋白的乳样为原料，通过预处理得到脱脂乳，再将所获得的脱脂乳进行阳离子交换层析分离，并去除内毒素，然后分别在不同盐浓度条件下将重组人乳铁蛋白与乳过氧化物酶洗脱分离，得到高纯度的乳铁蛋白及乳过氧化物酶，进一步通过疏水互作色谱将重组人乳铁蛋白与动物内源乳铁蛋白分离。进一步地，所述预处理为通过蝶式离心机进行脱脂，再利用 0.14μm ～ 1.4μm 膜技术进行除菌，得到无菌脱脂乳。

[0010] 进一步地，本发明可采用多种阳离子交换树脂，但最佳选择为高压高流速下能有较好的机械稳定性的产品，所选择的阳离子交换树脂的粒径大小范围为 90μm ～ 300μm，线性流速为 50cm/h ～ 300cm/h ；进一步选择疏水互作色谱进行分离纯化，配基密度范围为 20 ～ 50μmol，线性流速为 50cm/h ～ 100cm/h。

[0011] 作为优选，所述阳离子交换层析为在 1 ～ 10mM EDTA，2 ～ 6ms/cm，pH5 ～ 7.5 的磷酸盐缓冲液平衡离子交换层析柱上样后，用 8 ～ 15ms/cm 的 NaCl 或 KCl 缓冲液洗脱乳过氧化物酶，用 170ms/cm 以下的 NaCl 或 KCl 缓冲液单独乳铁蛋白。

[0012] 更为优选，所述阳离子交换层析为在 2 ～ 6ms/cm，pH5 ～ 7.5 的磷酸盐缓冲液平衡离子交换层析柱上样后，用 9 ～ 15ms/cm 的 NaCl 或 KCl 缓冲液中洗脱乳过氧化物酶，使用 126ms/cm 的 NaCl 或 KCl 缓冲液单独洗脱乳铁蛋白。

[0013] 进一步地，所述阳离子交换层析为在 2 ～ 6ms/cm，pH5 ～ 7.5 的磷酸盐缓冲液平衡离子交换层析柱上样后，用 2 ～ 6ms/cm，pH4.0 ～ 6.0 醋酸盐缓冲液继续平衡阳离子交换层析柱，而后直接使用 170ms/cm 以下的 NaCl 或 KCl 缓冲液洗脱乳铁蛋白。

[0014] 上述洗脱分离得到的重组人乳铁蛋白进一步通过疏水互作色谱分离纯化，所述的疏水互作色谱为上样到电导 100 ～ 60ms/cm 的硫酸铵，20 ～ 50mM，pH6.5 ～ 7.5 磷酸盐缓冲液平衡的疏水互作层析柱，包括 Phenyl、Butyl 和 Octyl 所有不同基质的疏水介质，优化 Phenyl，流速为 78 ～ 160cm/h，而后使用电导为 50-70ms/cm 的硫酸铵，20 ～ 50mM，pH6.5-7.5 磷酸盐缓冲液洗脱重组人乳铁蛋白，得到蛋白纯度≥ 99%，使用电导为 6ms/cm 以下的 20-50mM，磷酸盐缓冲液（pH6.5-7.5）洗脱动物内源乳铁蛋白，得到蛋白纯度≥ 99%。

[0015] 上述纯化方法所述的去除内毒素方法，为采用浓度为 0.1% ～ 2% 的非离子去污剂与浓度为 1mM ～ 10mM 的金属络合剂相结合去除乳铁蛋白纯品中的内毒素。

[0016] 上述纯化方法所述蛋白浓缩脱盐为将纯化得到的乳铁蛋白与乳过氧化物酶使用 50kD 以下的膜进行蛋白质浓缩脱盐。

[0017] 本发明还提供了利用前述纯化方法得到的重组人乳铁蛋白在抗菌产品的制备和生产中应用。

[0018] 本发明还提供了利用前述纯化方法得到的乳过氧化物酶在抗氧化产品的制备和生产中应用。

[0019] 本发明的有益效果在于 ：根据本发明所述方法得到的重组人乳铁蛋白的纯度≥ 99%，动物源乳铁蛋白的纯度≥ 99%，乳过氧化物酶的纯度≥ 80%，且重组人乳铁蛋白具有和天然人乳铁蛋白相似的理化活性和生理功能，整个工艺为一步纯化过程，因此成本低廉、简便，适用于工业化大规模生产。

## 附图说明

[0020] 图 1 为本发明实施例 2 中 SP Sepharose Big Beads 介质阳离子交换纯化色谱图（左）及各分离组分的 12%SDS-PAGE 电泳结果（右），方框内表示含有乳铁蛋白分离组分 ；FT 为杂蛋白穿透组分 ；P1 为 40%NaCl 梯度洗脱含有乳过氧化物酶组分 ；C 为天然人乳铁蛋白标准品。

[0021] 图 2 为本发明实施例 3 中 SP Sepharose Fast flow 介质阳离子交换纯化色谱图（左）及各分离组分的 12%SDS-PAGE 电泳结果（右），方框内表示含有乳铁蛋白分离组分 ；FT 为

杂蛋白穿透组分；P1 为 40%NaCl 梯度洗脱含有乳过氧化物酶组分；C 为天然人乳铁蛋白标准品。

[0022] 图 3 为本发明实施例 4 中 SP Sepharose XL 介质阳离子交换纯化色谱图(左)及各分离组分的 12%SDS-PAGE 电泳结果(右)，方框内表示含有乳铁蛋白分离组分；FT 为杂蛋白穿透组分；P 为 100%NaCl 梯度洗脱重组人乳铁蛋白；C 为天然人乳铁蛋白标准品。

[0023] 图 4 为本发明实施例 5 中分离纯重组人乳铁蛋白和牛乳铁蛋白的疏水互作色谱(左)及各分离组分的 12%SDS-PAGE 电泳结果(右)；M 为 Marker；BS 为天然牛乳铁蛋白标准品；HS 为天然人乳铁蛋白标准品；rHLF 为纯化后的重组人乳铁蛋白；BLF 为纯化后的牛乳铁蛋白。

[0024] 图 5 为本发明实施例 7 中重组人乳铁蛋白、天然人乳铁蛋白、牛乳铁蛋白抑菌活性检测结果。A 为沙门氏菌，B 为大肠杆菌，C 为表皮葡萄球菌，D 为白色念珠菌、E 为金黄色葡萄球菌。

## 具体实施方式

[0025] 以下实施例用于说明本发明，但不用来限制本发明的范围。

[0026] 实施例中所用的主要试验仪器与试剂如下：

[0027] AKTA Pilot 快速工艺开发及小规模生产液相层析系统、AKTA explorer100 快速蛋白液相层析系统、BPG140 层析柱、XK26/40 层析柱、SP Sepharose Big Beads 填料、SP Sepharose XL 填料、SP Sepharose Fast flow 填料、Resource PHE 层析柱、凝胶过滤色谱柱 Superdex2005/150GL 层析柱均购自 GE Healthcare；总抗氧化能力检测试剂盒(ABTS 法)购自碧云天；陶瓷膜冷除菌及超滤凭介装置(型号 TOP/CMM-1/3/3T)、1.4μm 陶瓷膜购自陶普森公司；Cogent M1TFF system (型号 2143)、Pellicon XL Filter PXB030A5030KD、购自 Millipore。

[0028] 实施例 1 含重组人乳铁蛋白乳样的预处理

[0029] 收集含有重组人乳铁蛋白(含量为 0.1-5 克 / 升)的哺乳动物奶样，包括含重组人乳铁蛋白的转基因动物奶样，也可以是混有重组人乳铁白蛋白的非转基因动物奶样，其中奶样以新鲜液态奶样为宜，也可以是冷冻样品解冻后或奶粉复溶后获得的液态奶样，哺乳动物奶样包括牛奶、羊奶、兔奶等，以牛奶为优选。首先将含重组人乳铁蛋白的牛乳通过蝶式离心机进行脱脂，得到脂肪含量＜ 0.2% 的脱脂乳，再利用 1.4μm 陶瓷膜技术进行牛乳中细菌的去除，操作温度为 0 ～ 35℃，进口压为 0.3MPa ～ 0.5MPa，而后打开透过阀门，将操作压设置为 0.1MPa ～ 0.3MPa，流速为 1m/s ～ 7m/s，通量为 100L • $m^2$/h ～ 500L • $m^2$/h，便可得到无菌的脱脂乳。

[0030] 实施例 2SP Sepharose Big Beads 阳离子交换层析分离

[0031] 实施例 1 制备得到的脱脂乳上样到用 5mM EDTA，3ms/cm，pH6.5 磷酸盐缓冲液平衡的 SP Sepharose Big Beads 阳离子交换层析柱，流速为 150cm/h，上样完毕后，使用 5mM EDTA，3ms/cm，pH6.5 磷酸盐缓冲液冲洗层析柱至基线，用 1%Triton X-114，13ms/cm 的 NaCl，3ms/cm 磷酸盐缓冲液(pH6.5)将富含乳过氧化物酶的蛋白溶液洗脱下来，通过凝胶过滤色谱进行纯度分析，该蛋白纯度≥ 80%。由于乳铁蛋白能与内毒素紧密结合从而限制了乳铁蛋白的抑菌能力，而使用非离子去污剂可以将内毒素包裹在囊内且金属络合剂可以将

内毒素与蛋白质之间形成的钙桥断开，因此本发明采用非离子去污剂(浓度为 0.1% ～ 2%)与金属络合剂(浓度为 1mM ～ 10mM)相结合的方法去除重组人乳铁蛋白纯品中的内毒素，在本实施例中优选 5mM EDTA 和 1%Triton X-114 去除内毒素，使得重组蛋白具有最佳的抑菌效果。而后用 13ms/cm 的 NaCl，3ms/cm 磷酸盐缓冲液(pH6.5)继续冲洗层析柱，可去除非离子型去污剂(1%Triton X-114)与其它杂蛋白，最后使用 84ms/cm 的 NaCl，20mM 磷酸盐缓冲液(pH6.5)单独洗脱乳铁蛋白，通过凝胶过滤色谱进行纯度分析，该蛋白纯度≥ 95%，内毒素≤ 0.5EU/mg 的乳铁蛋白纯品。图 1 为 SP Sepharose Big Beads 介质阳离子交换纯化色谱图(左)及各分离组分的 12%SDS-PAGE 电泳结果(右)。可见在 40%NaCl 预洗脱中将乳过氧化物酶洗脱下来，而 100%NaCl 洗脱单一的乳铁蛋白。

[0032] 实施例 3SP Sepharose Fast flow 阳离子交换层析分离

[0033] 将市售的 SP Sepharose Fast flow 填料装填于 XK26/40 层析柱中。将实施例 1 制备得到的脱脂乳上样到用 4ms/cm，pH6.0 磷酸盐缓冲液平衡的 SP Sepharose Fast flow 阳离子交换层析柱，流速为 74cm/h，上样完毕后，使用 4ms/cm，pH6.0 磷酸盐缓冲液冲洗层析柱待 280nm 吸收信号至基线，用 11ms/cm 的 NaCl，4ms/cm 磷酸盐缓冲液(pH6.0)将含有乳过氧化物酶的蛋白溶液洗脱下来，而后使用 84ms/cm 的 NaCl，4ms/cm 磷酸盐缓冲液(pH6.0)单一洗脱乳铁蛋白，通过凝胶过滤色谱进行纯度分析，该蛋白纯度≥ 95%，此时蛋白纯品溶液中含有 5% 的牛内源乳铁蛋白。图 2 为 SP Sepharose Fast flow 介质的阳离子交换纯化色谱图(左)及各分离组分的 12%SDS-PAGE 电泳结果(右)。可见用 SP Sepharose Fast flow 介质也可将乳铁蛋白与乳过氧化物酶分别在不同盐浓度条件下洗脱。

[0034] 实施例 4SP Sepharose XL 阳离子交换层析分离

[0035] 将市售的 SP Sepharose XL 填料装填于 XK26/40 层析柱中。将实施例 1 制备得到的脱脂乳上样到用 3ms/cm，pH7.0 磷酸盐缓冲液平衡的 SP Sepharose XL 阳离子交换层析柱，流速为 74cm/h，上样完毕后，使用 3ms/cm，pH7.0 磷酸盐缓冲液冲洗层析柱待 280nm 吸收信号至基线，可将酪蛋白及其它杂蛋白以穿透形式流穿层析柱，继续使用 3ms/cm，pH5.0 醋酸盐缓冲液平衡阳离子交换层析柱，用 84ms/cm 的 NaCl，4ms/cm 醋酸盐缓冲液(pH5.0)洗脱乳铁蛋白，通过凝胶过滤色谱进行纯度分析，该蛋白纯度≥ 90%。图 3 为 SP Sepharose XL 介质的阳离子交换纯化色谱图(左)及各分离组分的 12%SDS-PAGE 电泳结果(右)。可见用 SP Sepharose XL 介质也可将乳铁蛋白与乳过氧化物酶分别在不同盐浓度条件下洗脱。

[0036] 实施例 5 疏水互作色谱分离纯重组人乳铁蛋白和牛乳铁蛋白

[0037] 实施例 2、实施例 3 或实施例 4 得到的含有重组人乳铁蛋白与牛内源乳铁蛋白的洗脱液上样到电导为 130ms/cm 的硫酸铵，20mM 磷酸盐缓冲液(pH7.0)平衡的 Resource PHE 疏水互作层析柱，流速为 78cm/h，上样完毕用电导为 130ms/cm 的硫酸铵，20mM 磷酸盐缓冲液(pH7.0)冲洗层析柱待 280nm 吸收信号至基线，使用电导为 65ms/cm 的硫酸铵 20mM 磷酸盐缓冲液(pH7.0)洗脱重组人乳铁蛋白组分，通过凝胶过滤色谱进行纯度分析，重组人乳铁蛋白纯度≥ 99%，使用 6ms/cm 以下，pH7.0 磷酸盐缓冲液洗脱牛内源乳铁蛋白组分，通过凝胶过滤色谱进行纯度分析，牛乳铁蛋白纯度≥ 99%。图 4 为分离纯重组人乳铁蛋白和牛乳铁蛋白的疏水互作色谱(左)及各分离组分的 12%SDS-PAGE 电泳结果(右)。结果表明利用疏水互作色谱可以很好地将重组人乳铁蛋白与牛内源乳铁蛋白分离。

[0038] 实施例 6 重组人乳铁蛋白或乳过氧化物酶的蛋白质浓缩脱盐

[0039] 实施例 2、实施例 3、实施例 4 或实施例 5 得到的含有重组人乳铁蛋白或乳过氧化物酶的蛋白溶液装入 Cogent M1TFF system 的储液罐中，使用 50KD 以下的超滤膜装置，设置流速为 40ml/min，转膜压为 1bar 开始进行蛋白质浓缩脱盐。

[0040] 实施例 7 乳铁蛋白抑菌活性检测及其应用

[0041] 实施例 2-6 所得到的重组人乳铁蛋白纯品、牛乳铁蛋白纯品与市售的人乳铁蛋白纯品分别配置成 5mg/ml，在超净工作台中经 0.2μm 一次性无菌滤器过滤，使用无菌离心管倍比稀释配制成 5mg/ml、2.5mg/ml、1.25mg/ml、0.625mg/ml 四个不同浓度的乳铁蛋白溶液，将对数生长期的五种细菌（沙门氏菌，大肠杆菌，表皮葡萄球菌，白色念珠菌、金黄色葡萄球菌）浓度调整至 $3\times10^6$CFU/ml 以下并以 1:1000 比例接菌至 3ml 培养体系的蛋白溶液中，随后将含有乳铁蛋白溶液及细菌置于 37℃摇床中，6h 后检测含有不同乳铁蛋白细菌培养液的 $OD_{600}$。根据图 5 可知，实施例 2-6 所得到的重组人乳铁蛋白纯品、牛乳铁蛋白纯品与市售的人乳铁蛋白纯品均具有抗菌活性，且其抗菌活性，除表皮葡萄球菌当乳铁蛋白浓度大于 1.25mg/ml 时随乳铁蛋白浓度升高其抑菌活性反而下降，其余四种菌株均有随着乳铁蛋白浓度升高其抑菌活性增强趋势。抑菌活性检测结果表明，实施例 2-6 所得到的重组人乳铁蛋白纯品和牛乳铁蛋白纯品可用于制备和生产人用生物抗菌素、兽用生物抗菌素、食品防腐剂、饲料添加剂、抗菌化妆品等抗菌产品，可以起到抑制致病菌生长、延长食品储存时间、提高畜禽抗病力、抑制皮肤炎症等功效。

[0042] 实施例 8 乳过氧化物酶的抗氧化活性检测

[0043] 实施例 2-6 所得到浓缩脱盐后的乳过氧化物酶溶液使用磷酸盐缓冲液稀释成浓度为 0.125mg/ml、0.25mg/ml、0.5mg/ml、1mg/ml 和 2mg/ml，而后使用磷酸盐缓冲液将 ABTS 工作母液稀释若干倍，使 ABTS 工作液 $OD_{734}$ 值为 0.7；再用磷酸盐缓冲液将 Trolox 标准溶液稀释成浓度为 0.3mM；在 96 孔板中的每个孔加入 200μl ABTS 工作液，以磷酸盐缓冲液设为空白对照，在样品孔中加入不同浓度的乳过氧化物酶溶液，以 0.3mM Trolox 标准溶液为阳性对照，室温孵育 2 ～ 6 分钟后测定 $OD_{734}$。结果表明所纯化的乳过氧化物酶具有抗氧化活性，且其抗氧化活性随着其浓度的增加而增强。抗氧化活性检测结果表明，实施例 2-6 所得到的乳过氧化物酶纯品可用于抗氧化产品的开发中。

[0044] 虽然，上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述，但在本发明基础上，可以对之作一些修改或改进，这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此，在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进，均属于本发明要求保护的范围。

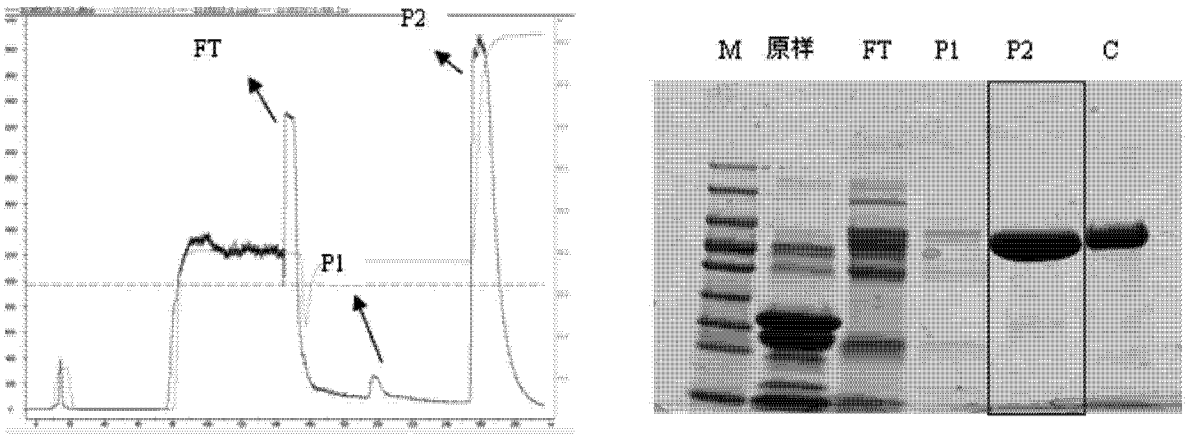

FT
P2
P1
M
原样
FT
P1
P2
C

图 1

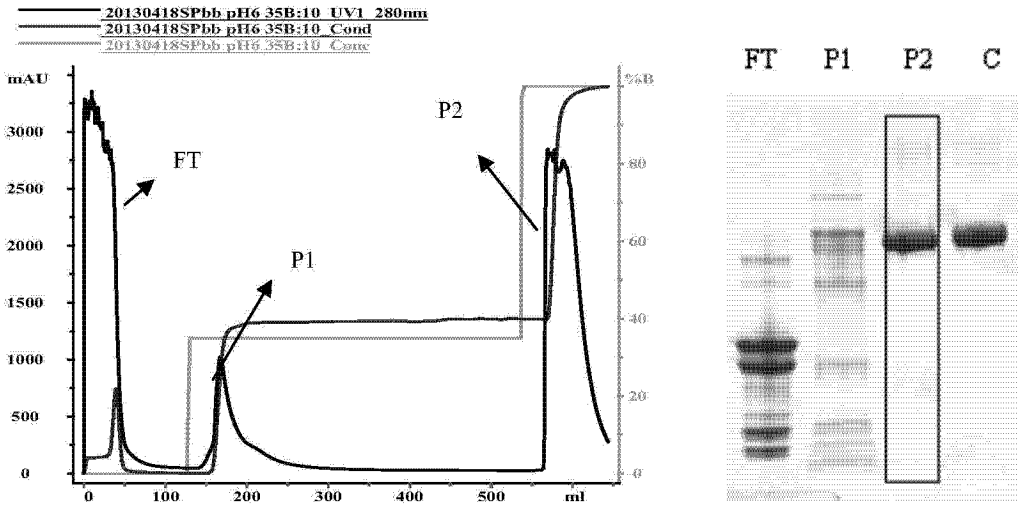

20130418SPbb pH6 35B:10_UV1_280nm
20130418SPbb pH6 35B:10_Cond
20130418SPbb pH6 35B:10_Conc
mAU
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
%B
80
60
40
20
0
0
100
200
300
400
500
ml
FT
P2
P1
FT
P1
P2
C

图 2

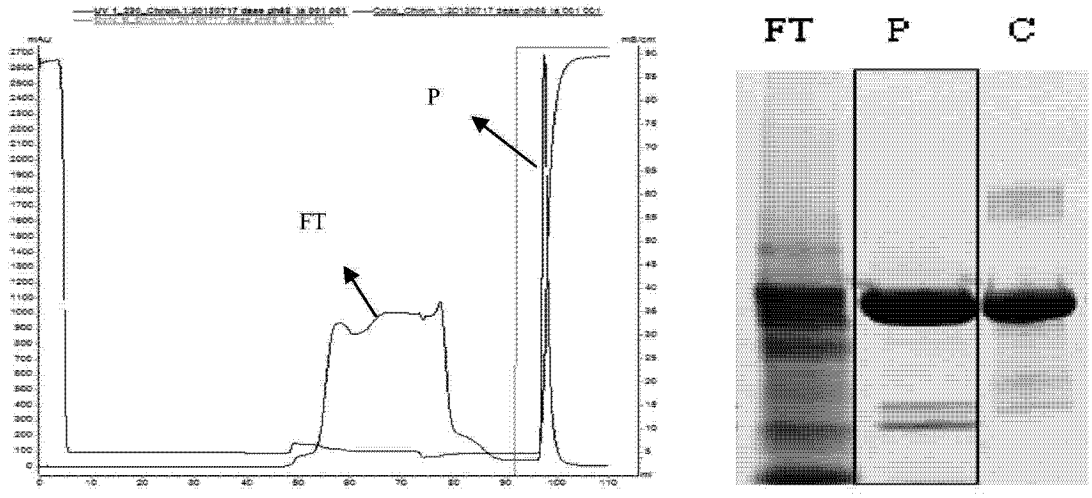



图 3

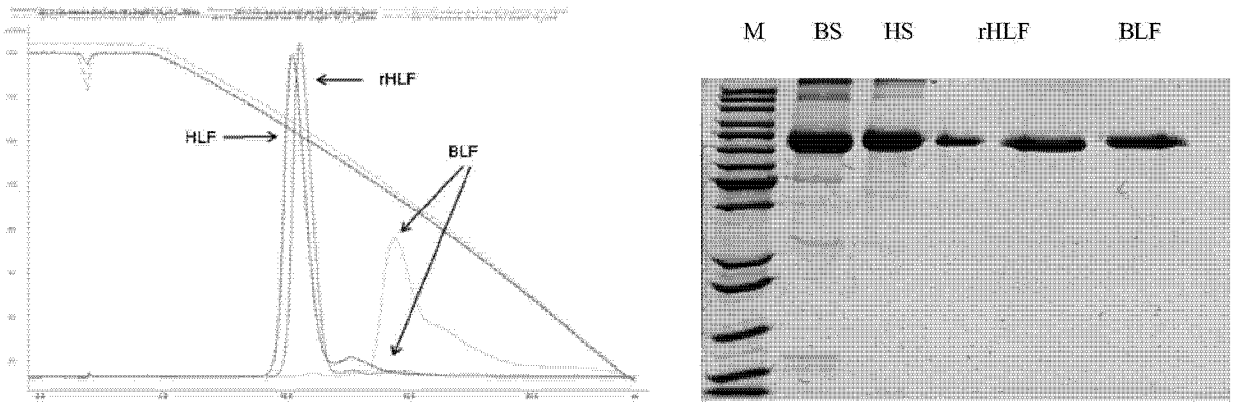



图 4

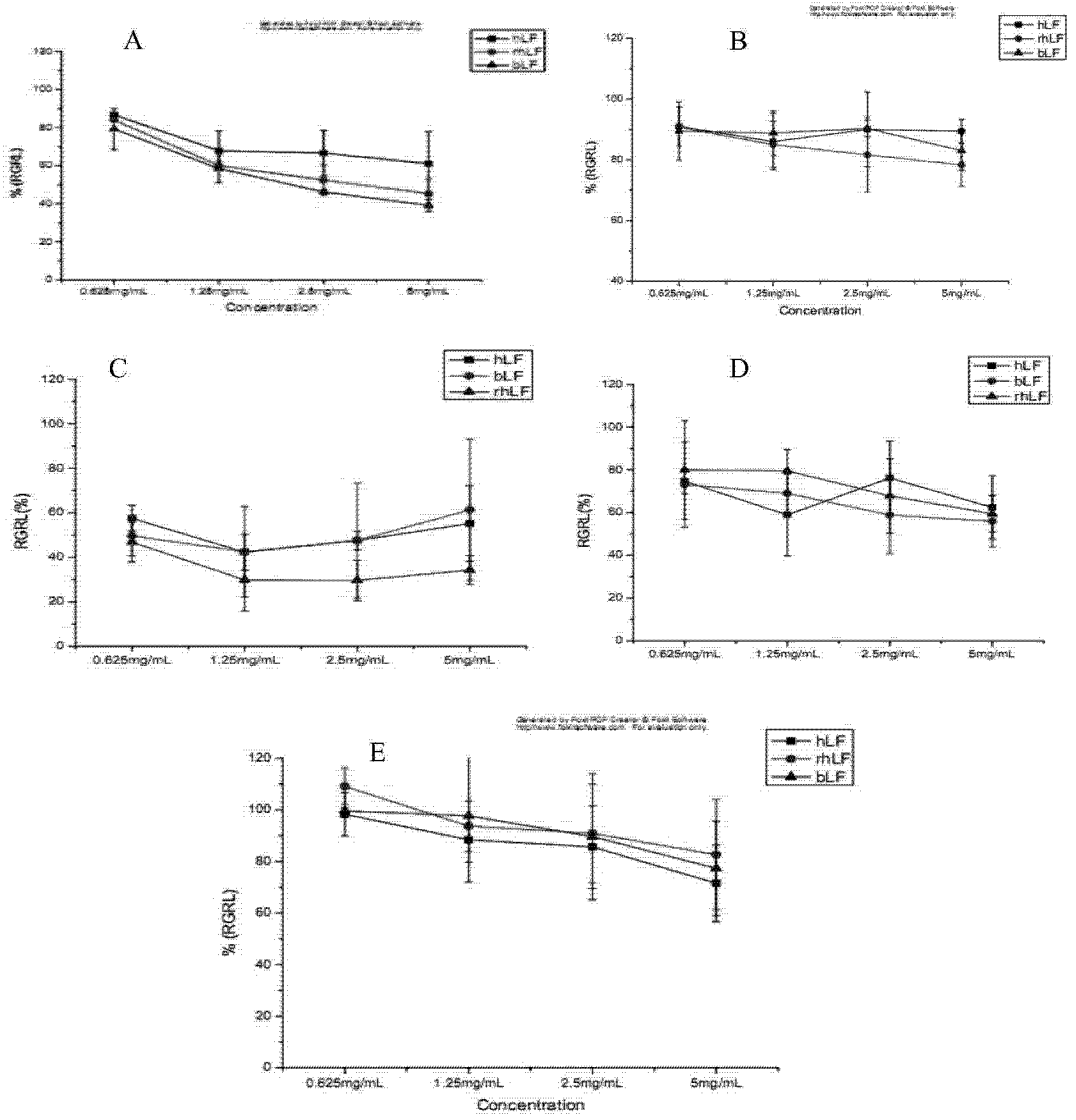

A
hLF
rhLF
bLF
% (RGRL)
Concentration
0.625mg/mL
1.25mg/mL
2.5mg/mL
5mg/mL
B
C
RGRL(%)
D
E

图 5