

快速高效液相色谱 (FPLC) 对猪脾干扰素的分离

黄文林 刘虹 孙松柏 王汉中
陈俊* 吴晰莹 罗经 杨学楼

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉)

提 要

本文以猪脾细胞干扰素为材料, 应用 FPLC 结合中性盐沉淀及离子交换层析分离纯化, 抗病毒活性回收率达 87.8%、FPLC 分离的峰一和峰二具有抗病毒活性, 用分析型层析柱对二个峰与标准人 α 、 γ 干扰素进行洗脱时间比较, 前者为 α 、分子量 20,000, 后者为 γ 、分子量为 43,000 道尔顿。

快速高效液相色谱具有非常高的分离效果, 是进行蛋白质分子分离纯化的重要手段, 也是进行多肽、蛋白质定性分析的方法之一。FPLC 具有快速、分辨率高、重复性好的特点。我们应用快速高效液相色谱对猪脾细胞干扰素 (PsIFN) 进行有效分离, 并对分离物作了初步分析。

材 料 与 设 备

猪脾细胞干扰素 分离新鲜猪脾细胞经新城疫鸡瘟病毒 F 系 (NDV-F) 诱生获得猪脾细胞干扰素混合物。

人胚肺二倍体细胞 (2BS) 由同济医科大学微生物教研室提供。

羊膜细胞 由成都生物制品所提供。

攻击病毒株 滤泡性口炎病毒 (VSV), 中国预防医学中心病毒研究所提供。

人 α 干扰素标准品 由法国巴斯德研究所提供。

人 γ 干扰素标准品 由中国科学院上海生物化学研究所刘新恒教授提供。

标准分子量蛋白 上海东风化学试剂厂。

CM-纤维素 英国产品。

仪器设备 快速高效液相色谱仪 GP-250

型、LCC-500 型、DEAE-Sephrose FF 封闭柱、monoQ^{HR} 5/5 封闭柱均是瑞典 pharmacia 仪器公司的产品。

方 法 与 结 果

一、提纯方法

1. 饱和硫酸铵分级沉淀分离猪脾细胞干扰素: 猪脾细胞经新城疫鸡瘟病毒诱生获得的干扰素混合物在人胚肺二倍体细胞测得抗病毒效价为 3.2×10^4 u/ml。取 100 毫升粗制猪脾细胞干扰素混合物加饱和硫酸铵溶液使成 10%、30%、70% 饱和度, 进行分级沉淀, 每次加入硫

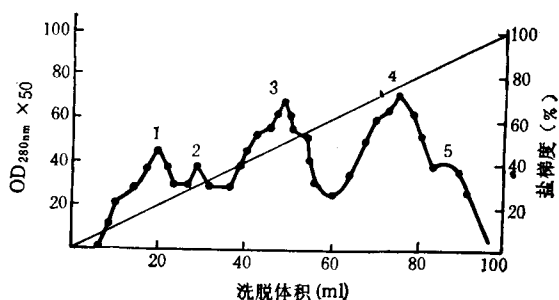


图 1 CM-纤维素柱层析对硫酸铵沉淀的猪脾活性部分的分离
1、2、3、4、5 为各洗脱峰。

* 湖北省科委生物工程研究开发中心

酸铵后放入冰箱(4℃)四小时左右,取出后用 3.500r/m 离心 30 分钟,将 70% 饱和硫酸铵沉淀物用 pH7.4, 0.05mol/L PB (磷酸缓冲液)溶解,装入透析袋中,置 pH7.4, 0.02mol/L PB 中透析过夜。

2. 羧甲基纤维素 (CMC) 对猪脾细胞干扰素分离:层析柱内径 1.2cm,柱床高度 35cm,

洗脱液为 A.B.两部分, A:0.02mol/L PB, pH 7.4, B: 0.02mol/L PB, pH7.4, 内含 1mol/L NaCl。由 GP-250 型 FPLC 自动梯度混合仪形成线形梯度,上样体积 3 毫升,流速每分钟 0.5ml,流出液经 OD_{280nm} 自动检测绘图记录,收集各洗脱峰进行抗病毒活性测定,结果见图 1、表 1。

表 1 DEAE-Sephrose FF 层析前后干扰素活性比较

	单 位 总 数			比活 (U/mg)	效价 (U/ml)	活性回收率 (%)	纯化倍数	总活性回收率 (%)
	体积 (ml)	蛋白 (mg)	效价 (U)					
(NH ₄) ₂ SO ₄ 沉淀前	100	未检	3.2×10 ⁴		3.2×10 ⁴			
DEAE-Sephrose FF 层析前 (CMC 峰 2.3)	40	1200	2.56×10 ⁴	2.13×10 ³	6.4×10 ⁴	80		
DEAE-Sephrose FF 层析后(1.2 峰)	5	25	2.25×10 ⁶	9×10 ⁴	4.5×10 ⁵	87.8	42.8	70.3

过柱前 PEG6000 浓缩 三次实验平均值。

3. DEAE-Sephrose FF 柱对猪脾细胞干扰素的分离:

取抗病毒活性较高的峰 2、3 部分经 PEG6000 (聚乙二醇 6000)浓缩体积到 2.5ml,上 DEAE-Sephrose FF 层析柱,洗脱液由 A.B = 二部分组成, A:100mmol/L Tris-HCl, pH7.4, B: 100mmol/L Tris-HCl, pH7.4, 500mmol/L NaCl, 由 FPLC-GP-250 型自动梯度混合仪形成线形盐梯度,流速 0.5ml/min,流出液经 OD280nm 自动检测绘图记录,整个程序理论值为 100%,时间为 15 分钟。流出物可分为五个洗脱峰,收集各峰作干扰素抗病毒活性测定,活性集中在第一峰及第二峰。效价分别为 2.2 × 10⁶u 及 5 × 10⁴u/5ml,猪脾细胞干扰素

经 DEAE-Sephrose FF 柱分离纯化的总活性回收率达90%左右,见图 2,表 1。

二、PαIFN 的鉴定

将 DEAE-Sephrose FF 柱分离的第一

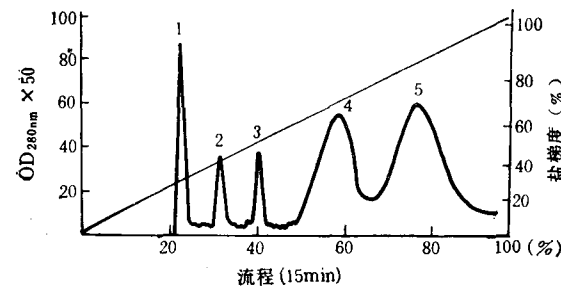


图 2 经 CMC 过柱收集抗病毒活性峰再经 DEAE-Sephrose FF 柱分离

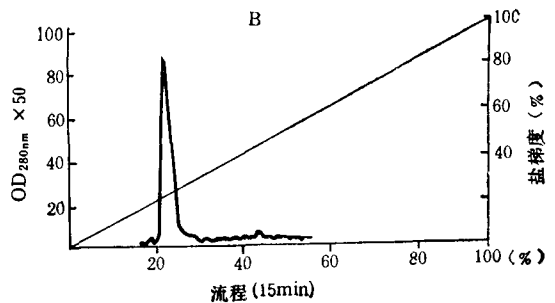
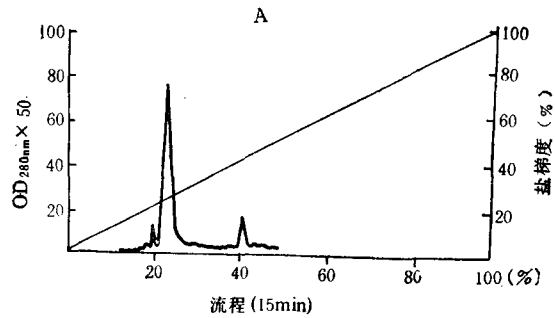


图 3A DEAE-Sephrose FF 柱分离峰 1 在 monoQ^{HR}5/5 柱上分析结果

图 3B 标准人 α 干扰素在 monoQ^{HR}5/5 柱上分析结果

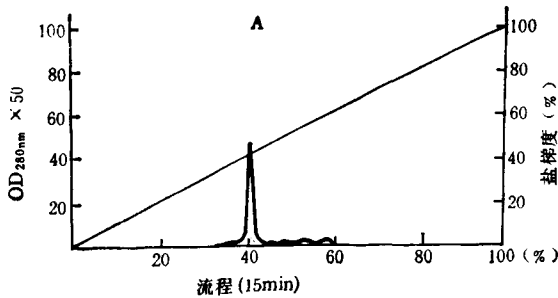


图 4A DEAE-Sepharose FF 柱分离的第二峰在 monoQ^{HR}5/5 柱上的分析结果

图 4B 标准人 γ 干扰素在 monoQ^{HR}5/5 柱上分析结果峰, 第二峰分别上 monoQ^{HR}5/5 柱, 通过 LCC-500 型 FPLC 自动程序系统控制。洗脱液同前节 3, 柱压 3MPa, 流程 15 分钟, 上样体积 0.05ml。流出液经 OD_{280nm} 自动检测绘图记录, 灵敏度为 0.2AUFS。同时设标准人 α 干扰素及人 γ 干扰素作对照。在 monoQ^{HR}5/5 柱上可见峰 1, 峰 2 样品各呈现一个峰(图 3A.4A); 峰

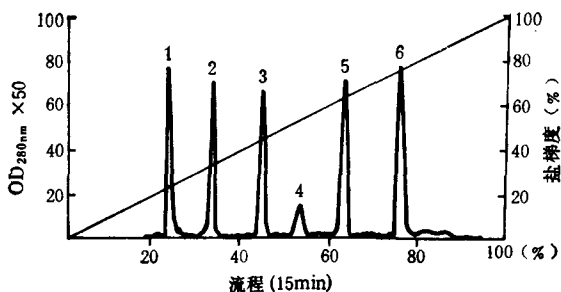


图 5A 标准分子量蛋白在 monoQ^{HR}5/5 柱层析行为

峰 1, 烟草花叶外壳蛋白	MW 17,500
峰 2, 碳酸酐酶	MW 30,000
峰 3, 肌动蛋白	MW 43,000
峰 4, 烟草花叶外壳蛋白三聚体	MW 53,000
峰 5, 牛血清蛋白	MW 68,400
峰 6, 磷酸化酶 B	MW 95,000

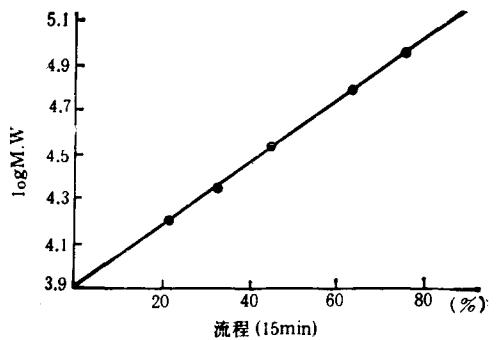


图 5B 分子量标准曲线

1、峰 2 分别与标准干扰素 α 、 γ 出峰时间一致(图 3B.4B)。

三、PsIFN 分子量的测定

将标准分子量的蛋白质上 monoQ^{HR}5/5 层析柱, 用 LCC-500 型 FPLC 自动程序系统控制。洗脱液同前节 3。上样体积 0.05ml, 流出液经 OD_{280nm} 自动检测记录, 灵敏度 0.2 AUFS。以标准分子量蛋白作图, 证明经 DEAE-Sepharose FF 分离的峰 1 和峰 2 分别为 20,000 道尔顿和 43,000 道尔顿左右, 见图 5A、5B。

以蛋白质在 monoQ^{HR}5/5 柱的流程理论值作横坐标, 分子量对数作纵坐标, 制成分子量标准曲线图, 查出 DEAE-Sepharose FF 分离的峰 1、峰 2 的位置, 计算分子量。

讨 论

1. 猪脾细胞干扰素是继猪白细胞干扰素之后又一干扰素研究对象, 其材料来源丰富, 工艺比制备白细胞干扰素简单, 而且经新城鸡瘟病毒诱生的猪脾细胞干扰素活性高于猪白细胞干扰素 21.3 倍^[1], 同时具有猪白细胞干扰素在异源细胞表达的抗病毒活性, 与人白细胞干扰素有较高的同源性等特性^[2-5]。

2. 猪脾细胞干扰素经高效快速液相色谱系统分离纯化, 应用分析柱对其分离物与标准人 α 、 γ 干扰素进行了比较, 从层析分析, 它具备 α 、 γ 干扰素混合型活性蛋白质, 纯化后经 monoQ^{HR}5/5 柱分析, DEAE-Sepharose FF 柱

(下转第 226 页)

6. 本文提供了一种用电子计算机量取电镜照片 DNA 长度, 从而计算质粒 DNA 分子量的方法。以前, 我们采用细铜丝手工量取电镜照片上 DNA 长度, 这种方法相对地说重复性差, 误差大, 而且还费时费力, 更不适宜做大规模数据处理, 使用计算机量取长度可以消除一些人为因素, 减小误差, 为利用核酸电泳法测定未知质粒种类及其分子量提供了一种好的方法。

参 考 文 献

[1] Puhler, A. et al.: *Advanced Molecular Genetics*,

Springer Verlag, 1984, 209.

[2] Stuber, D. et al.: *MGG*, 1977, 154, 299.

[3] Birnboim, H. C. et al.: *Nucl. Acid. Res.*, 1979, 7, 1513.

[4] Santamaria, R. and Martin, J. F.: *Journal of General Microbiology*, 1984, 130, 2237.

[5] 朱丽霞: «生物学中的电子显微镜技术», 北大出版社, 1982, 38 页.

[6] Davis, R. W. et al.: *Advanced Bacterial Genetics*, C. S. H., 1980, 188.

[7] 成瀨, 鸟脇, 福村: «濃淡画像の細線化手法の比较研究», 电子通信学会论文志, 1977, 60, 12.

[8] Rosenfeld, A. et al.: *J. A. C. M.*, 1971, 18, 255.

[本文于 1987 年 6 月 18 日收到]

(上接第 233 页)

分离的五个峰的峰 1、2 具有抗病毒活性, 两个活性峰分别与标准 α 、 γ 干扰素出峰时间一致。这可能是猪脾细胞干扰素抗病毒活性高于白细胞干扰素的原因之一, 因 α 、 γ 同时存在可以提高抗病毒活性。

3. 将猪脾细胞干扰素纯化物与标准分子量蛋白坐标图比较计算分子量, 根据标准分子量的峰形分析, 峰 4 可能是峰 1 的三聚体, 故推测经 DEAE-Sephrose FF 分离的峰 1 在 mono Q^{HR}5/5 柱分析, 表现的主峰和次峰的关系可能是猪脾细胞干扰素的二聚体物质。测得猪脾细胞干扰素 α 、 γ 分子量分别为 20,000 及 43,000 道尔顿左右。

我们采用沉淀与层析相结合的实验方案, 使干扰素的总活性回收率达 70.3%, 而经 DEAE-Sephrose FF 柱快速高效液相色谱自动程序分离系统一步活性回收率达 87.8%, 纯化 42.8 倍。以上结果说明, 快速高效液相色谱

对活性蛋白质具有快速、简便、高度纯化的效果, 此方法不致于因为纯化步骤中操作时间过长, 而使生物活性蛋白失去活性^[6]。另外, 快速高效液相色谱具有灵敏度高、分离效果好等优点, 对于生物、医学、农业以及其它涉及到蛋白、核酸等生物活性物质的领域有重要的实际意义。

本文承蒙方慈祺教授悉心指导, 特此致谢。

参 考 文 献

[1] 吴旭初: «福建师范大学学报»自然科学报, 1986, 2(1), 57.

[2] Carter, W.A. et al.: *Mol. pharmacol.*, 1979, 15, 685.

[3] Соловиев, В.Д.: *Вол. Вир.*, 1980, 5, 523.

[4] 罗经, 杨学楼等: «病毒学集刊», 1987, 5, 81.

[5] 黄文林等: «病毒学杂志», 1988, 3, 印刷中.

[6] 张仁斌等: «高效液相色谱在医学研究中的应用», 上海科学技术出版社, 上海, 1983, 135—140 页.

[本文于 1987 年 12 月 21 日收到]