

tein Res, 1987; 30: 135

18 Godchaux W, Adamson S D, Herbert E. J Mol Biol, 1967; 27: 57

19 Moldave K, Grossman L. Methods in enzymology. 1974; X X X part F (67a): 724

20 王润华, 郑 硕, 陈 兴等. 生物化学杂志, 1992; 8(4): 395

**Isolation and Purification of  $\alpha$ - and  $\beta$ -Luffins, Ribosome Inactivating Protein from Seeds of *Luffa cylindrica*.** Wu Shen, Zhu Yuerong, Guo Feng, Liu Duohua (*Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101, China*).

**Abstract**  $\alpha$ - and  $\beta$ -luffins were easily and quickly isolated and purified from seeds of

*Luffa cylindrica* by using an improved procedure that involved ammonium sulfate precipitation, ion exchange chromatography on S Sepharose Fast Flow and gel filtration on Sephadex G-75.  $\alpha$ - and  $\beta$ -luffins were basic proteins with isoelectric points of about 10, with molecular weight of 28 000 and 29 000, respectively, as judged by SDS-PAGE. Inhibitory activities of  $\alpha$ -luffin and  $\beta$ -luffin on cell-free protein synthesis were stronger than that of any known type-1 RIPs, with  $ID_{50}$  10  $\mu$ g/L and 50  $\mu$ g/L, respectively.

**Key words** ribosome inactivating protein, luffin, purification of protein, column chromatography

## 离子交换柱层析法纯化重组人 IL-4\*

王 宏 王锦娟 李 燕 刘 洁 陈慰峰

(北京医科大学免疫学教研室, 北京 100083)

**摘要** 用离子交换层析法一步纯化重组人白细胞介素 4, 该方法简单易行, 对样品不产生稀释作用; 所得产品具有高纯度 ( $\geq 95\%$ ), 高生物学活性 ( $\geq 10$  MU/mg) 和低毒性 (内毒素含量  $\leq 0.5$  ZU/L) 的特点, 可满足实验室工作的需要. 当与凝胶过滤法结合使用时, 所得产品纯度可达 98%, 生物学活性进一步提高.

**关键词** 重组人白细胞介素 4, 纯化, 离子交换

人白细胞介素 4 (hIL-4) 是一种对人的 T 细胞和 B 细胞均有生长刺激作用的多功能因子, 其在免疫调节及抗炎症中的作用日益受到重视. 而研究这类作用的前提条件之一就是要通过基因工程的方法生产出具有高纯度, 高生物学活性, 低毒性的重组 hIL-4 的产品, 以满足科研工作以及临床试用的需要. 自 1986 年 Yokota 等<sup>[1]</sup>首次利用小鼠 IL-4 cDNA 片段作为探针克隆出人 IL-4 cDNA 以来, 国际上许多学者对重组人白细胞介素 4 (rhIL-4) 的制备及纯化进行了研究<sup>[2~5]</sup>, 大多数为分子筛层析.

我室也开展了这方面的工作<sup>[6]</sup>. 在保证产品的高纯度, 高活性和低毒性的前提下, 如何做到制备纯化流程相对简单易于开展, 目前的研究结果还不甚理想. 为此, 我们在本实验室对制备方法改进的基础上, 分别探讨了利用两种阳离子交换柱纯化 rhIL-4 的途径以及在此基础上结合其它方法进一步纯化的效果, 以期获得更好的制备纯化方法.

\* 国家“863”计划资助项目.

收稿日期: 1994-11-19, 修回日期: 1995-05-22

## 1 材料与方法

### 1.1 工程菌的转化、培养和温度诱导表达

大肠杆菌 DH5 $\alpha$  (美国 DNAX 研究所惠赠), 质粒载体 pBV220 (中国预防医学科学院病毒所惠赠). 应用 PCR 技术构建成 pBV220/hIL-4 重组质粒, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 转化菌株在 30 $^{\circ}$ C 扩增, 42 $^{\circ}$ C 诱导表达.

### 1.2 包涵体的提取、洗涤及变性处理

表达菌体经渗透休克后进行超声破碎 (Cole-parmer 7140 series 超声粉碎仪), 收集包涵体, 经含 Triton X-100 及 EDTA 的缓冲液交替洗涤后, 用含 6 mol/L 盐酸胍的 Tris-HCl 缓冲液对洗涤后包涵体进行变性处理.

### 1.3 rhIL-4 蛋白的复性和复性液的浓缩及透析

复性液为含 600 mmol/L 盐酸胍及谷胱甘肽氧化还原体系的磷酸盐缓冲液, 采用稀释复性的方法, 将变性蛋白液逐滴加入复性液中, 使蛋白终浓度达到 0.1 g/L. 充分复性后, 离心去除沉淀, 经 Millipore 浓缩仪浓缩 (分子量截流 5000), 再经缓冲液充分透析, 以去除残留的盐酸胍, 避免其对 rhIL-4 活性的影响.

### 1.4 离子交换层析纯化 rhIL-4

**1.4.1 强阳离子交换层析法:** 丙磺基-琼脂糖强阳离子快流交换柱 (SP-FF, Pharmacia) 柱床体积: 15 ml. rhIL-4 复性浓缩液在起始缓冲液 (50 mmol/L PB, 50 mmol/L NaCl, pH7.2) 中平衡后上柱, 上样浓度 0.5 g/L, 流速 1 ml/min, 经起始缓冲液洗脱, 收集不结合相; 继以洗脱缓冲液 (50 mmol/L PB, 500 mmol/L NaCl, pH7.2) 洗脱, 收集结合相, 进行 rhIL-4 纯度及比活性分析.

**1.4.2 弱阳离子交换层析法:** 羧甲基-琼脂糖弱阳离子快流交换柱 (CM-FF, Pharmacia) 柱床体积: 15 ml. rhIL-4 复性浓缩液在含 25 mmol/L NaCl pH5.5 枸橼酸钠缓冲液 (SCB) 中透析, 平衡后上样于已用相同 SCB 平衡的 CM-FF 柱. 先以 NaCl 连续浓度梯度洗脱以确定最适洗脱条件, 再行 NaCl 分步洗脱, 收

集富含 rhIL-4 组分进行纯度、比活性及内毒素测定.

**1.4.3 CM-FF 结合 Superdex G75 纯化 rhIL-4:** 将上述 CM-FF 层析纯化之 rhIL-4 样品浓缩至 0.77 g/L, 以 20 mmol/L pH7.4 的 PB 充分透析后载样于 Superdex G75 (FPLC, Pharmacia) 行分子筛层析. 洗脱后收集目的峰, 以高压液相色谱仪进行纯度分析.

### 1.5 纯化 rhIL-4 蛋白的测定

**1.5.1 蛋白及核酸含量的测定:** 蛋白定量采用 Bradford 比色法<sup>[7]</sup>; 核酸含量测定用 260 nm 紫外吸收法.

**1.5.2 纯度测定:** 将纯化蛋白行 SDS-PAGE 高分辨电泳<sup>[8]</sup>, 胶经银染后以 Beckman DU650 分光光度计先对着色带进行光谱分析, 以确定最佳胶扫描波长, 然后进行胶扫描 (波长 490 nm, 每毫米读数 2 次). 仪器对扫描峰进行自动面积积分后, 给出各峰的百分比, 以此得出目的蛋白的纯度. 高压液相色谱法分析蛋白纯度采用 C4 反相柱 (进口填料, 中国科学院大连物理化学研究所装) 在 Spectrum Physics 高压液相色谱仪上进行. 洗脱采用 0.1% 三氟乙酸 0%~80% 乙腈梯度, 流速 1 ml/min.

**1.5.3 生物活性检测:** 采用 CTLL-2/hIL-4R 细胞对人 IL-4 特异增殖应答检测法. 此克隆化细胞 (Harada 博士惠赠) 整合有人 IL-4 受体 (hIL-4R) cDNA 全序列, 该细胞表面表达 hIL-4R, 特异结合人 IL-4 后细胞增殖, 其增殖程度与 IL-4 剂量呈正相关, 可特异定量测定 rIL-4 含量, 其敏感度可测出 160 U/L (另文发表).

**1.5.4 内毒素 (ET) 的测定:** 按鲎试剂盒 (厦门鲎试剂厂) 说明测定, 此批试剂盒检测内毒素灵敏度为 0.5 ZU/L. Millipore-QUF plus 纯水器制备的无热源超纯水制备各种层析缓冲液, 平衡层析柱 (CM-FF) 至流出液经检测无热源 (0.5 ZU/L). rIL-4 粗提液经无热源水制备的缓冲液透析后, 上样于 CM-FF 柱进行层析, 收集 rIL-4 洗脱峰, 测定其内毒素含量.

## 2 结 果

图 1 和表 1 分别为 SP-FF 强阳离子交换

柱纯化 rhIL-4 的电泳银染扫胶图及各部纯化效果. 经 SP-FF 柱进一步纯化, rhIL-4 蛋白纯度可达 96% (图 1), 比活性达 12 GU/L, 回收率为 33%.

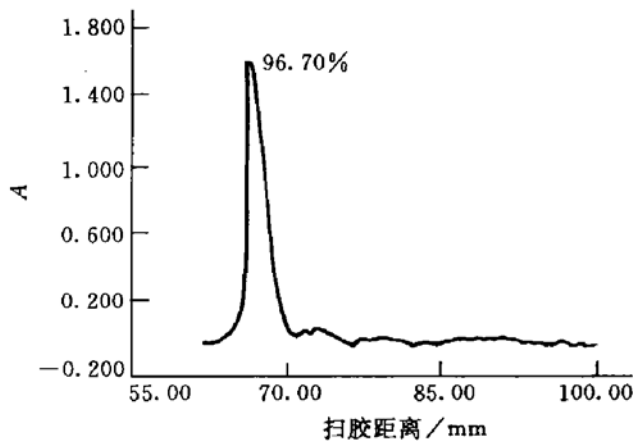


图 1 SP-FF 离子交换层析纯化 rhIL-4

表 1 SP-Sepharose Fast Flow 离子交换层析纯化 rhIL-4 效果

| 纯化步骤     | 总蛋白量/mg          | rhIL-4 量/mg    | rhIL-4 纯度/%    | 回收率/% | 比活性/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ |
|----------|------------------|----------------|----------------|-------|--------------------------------------|
| 菌体       | 120.0 $\pm$ 15.3 | 39.6 $\pm$ 1.6 | 33.0 $\pm$ 2.5 | 100   | ND <sup>1)</sup>                     |
| 裂解液      | 50.0 $\pm$ 10.8  | 36.5 $\pm$ 6.5 | 73.0 $\pm$ 2.5 | 88    | ND                                   |
| 复性浓缩液    | 30.0 $\pm$ 4.2   | 24.0 $\pm$ 3.4 | 81.0 $\pm$ 2.0 | 60    | ND                                   |
| 透析离心液    | 21.1 $\pm$ 0.5   | 18.3 $\pm$ 0.5 | 84.2 $\pm$ 0.8 | 46    | ND                                   |
| SP-FF 层析 | 16.4 $\pm$ 0.3   | 15.6 $\pm$ 0.2 | 95.3 $\pm$ 0.9 | 33    | 1.2 $\times 10^7$                    |

<sup>1)</sup>ND=未作测定, 数据为 3 次试验平均结果.

500 mmol/L 洗脱下的主要为杂蛋白, 亦含有少量 rhIL-4 蛋白; 而 SCB+750 mmol/L NaCl 的绝大部分洗脱成分为 rhIL-4.

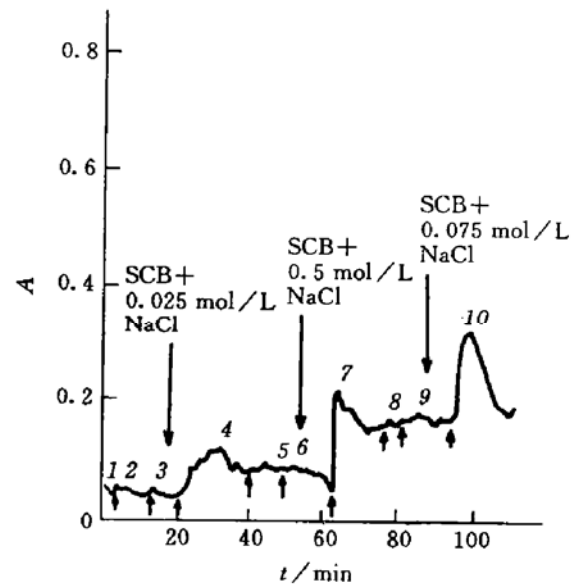


图 2 CM-FF 一步层析纯化 rhIL-4

图 3 为 CM-FF 洗脱下的富含 rhIL-4 组分 SDS-PAGE 银染的扫胶分析结果. 可见 rhIL-4 纯度达 96.8%. 经进一步分析, 该方法的 rhIL-4 蛋白的回收率为 25%, 比活性为 10 MU/mg (表 2). 其内毒素的含量经检测  $<0.5 \text{ ZU/L}$ .

表 2 CM-Sepharose Fast Flow 离子交换层析纯化 rhIL-4 效果

| 纯化步骤     | 总蛋白量/mg          | rhIL-4 量/mg    | rhIL-4 纯度/%    | 回收率/% | 比活性/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ |
|----------|------------------|----------------|----------------|-------|--------------------------------------|
| 菌体       | 120.0 $\pm$ 15.3 | 39.6 $\pm$ 1.6 | 33.0 $\pm$ 2.5 | 100   | ND <sup>1)</sup>                     |
| 裂解液      | 50.0 $\pm$ 10.8  | 36.5 $\pm$ 6.5 | 73.0 $\pm$ 2.5 | 88    | ND                                   |
| 复性浓缩液    | 30.0 $\pm$ 4.2   | 24.0 $\pm$ 3.4 | 81.0 $\pm$ 2.0 | 60    | ND                                   |
| 透析离心液    | 20.0 $\pm$ 0.4   | 17.4 $\pm$ 0.4 | 87.0 $\pm$ 0.9 | 44    | ND                                   |
| CM-FF 层析 | 10.2 $\pm$ 0.5   | 9.8 $\pm$ 0.3  | 96.8 $\pm$ 0.7 | 25    | 1.0 $\times 10^7$                    |

<sup>1)</sup>ND=未作测定, 数据为 3 次试验平均结果.

图 2 显示 CM-FF 弱阳离子交换柱一步纯化 rhIL-4 的紫外吸收 (280 nm) 层析图. 从图 2 可见三个洗脱峰, 经检测, SCB+25 mmol/L NaCl 洗脱组分以核酸为主; SCB+

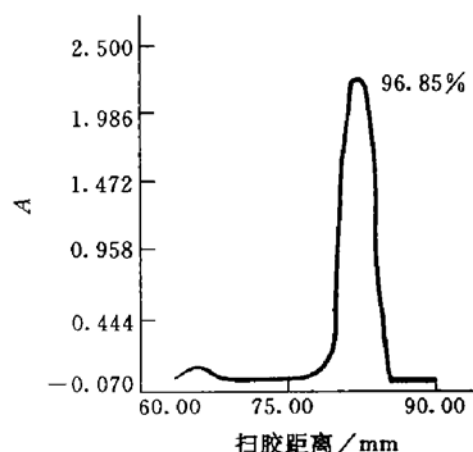


图3 CM离子交换纯化重组rhIL-4

### 3 讨论

对重组蛋白产品的主要质量要求为高纯度, 高活性及低毒性, 人重组白细胞介素4的下游纯化也应根据此要求进行, 在此基础上尽量做到方法简单易行. Jayaram等<sup>[2]</sup>通过三步过柱纯化rhIL-4, 比活性仅为4 MU/mg, 不但步骤繁琐且所得产品活性不高. Kimmenade等<sup>[3]</sup>经Bio-Gel P-30一步凝胶过滤法其产品纯度达95%, 比活性为50 MU/mg. 但凝胶过滤作为纯化手段有其缺点, 首先, 上样浓度要求高, 因此要求对上样前样品进行高度浓缩, 这势必导致样品在浓缩过程中的丢失. 其次, 凝胶过滤本身对样品产生较大的稀释作用, 且去内毒素作用效果不理想. 李晨等<sup>[6]</sup>应用DEAE结合Superose 12二步纯化rhIL-4, 其纯度可近100%, 但比活性较低, 为1.9 MU/mg, 这可能与当时rhIL-4复性不完全相关. 此外, rhIL-4蛋白在DEAE阴离子交换体系中为非结合相, 在层析中易产生稀释作用. 除此之外, 核酸及内毒素作为结合相与交换柱结合, 也不利于柱床的清洗和再生.

本文介绍的强及弱两种不同的阳离子交换纯化途径均能经一步过柱纯化使rhIL-4的纯度达95%, 比活性达10 MU/mg, 可满足实验室研究的需要. 由于内毒素及核酸分布于不结合相, 因此本方法还同时具有去除内热源和核

酸, 保证产品低毒性的作用. 此外, 该方法对作为结合相的rhIL-4不产生稀释作用, 有利于其活性的保持及后续的操作.

为使rhIL-4产品具有临床应用的潜力, 我们在CM柱纯化的基础上又探讨了用Superdex G75分子筛二步纯化的途径. 经此二步纯化后, rhIL-4纯度可达98%, 比活性为12 MU/mg, 基本符合要求.

综上所述, 本文所介绍的离子交换层析法纯化的rhIL-4样品具有高纯度, 高活性, 低毒性的优点, 该方法简单易行, 为今后国内开展这方面工作打下了良好的基础.

### 参考文献

- 1 Yokota T, Otsuka T, Mosmann T *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1986; **93**: 5894
- 2 Jayaram B, Devos R, Guisez Y *et al.* Gene, 1989; **79**: 345
- 3 Kimmenade A, Bond M W, Schumacher J H *et al.* Eur J Biochem, 1988; **173**: 109
- 4 Carr C, Aytent S, Kimack N M *et al.* Biochemistry, 1991; **30**: 1515
- 5 Park L S, Friend D, Sassenfeld H M *et al.* J Exp Med, 1987; **166**: 476
- 6 李晨, 张智清, 周圆等. 生物化学杂志, 1993; **9**: 148
- 7 Bradford M N. Anal Biochem, 1976; **72**: 248
- 8 Chagger H, Jagow G. Anal Biochem, 1987; **166**: 368

**Purification of Recombinant Human Interleukin-4 with Ion-Exchange Chromatography.** Wang Hong, Wang Jinjuan, Li Yan, Liu Jie, Chen Weifeng (Department of Immunology, Beijing Medical University, Beijing 100083, China).

**Abstract** Laboratory investigations for one step purification of recombinant human IL-4 (rhIL-4) with cation ion-exchange chromatography are presented. The method is easy to operate and gives no dilution effect on the sample. The purified rhIL-4 is of high purity ( $\geq 95\%$ ), high biological activity ( $\geq 10$  MU/mg) and low toxicity ( $ET \leq 0.5$  ZU/L),

which meets the criteria of cytokines for the further experimental research. Furthermore, purity of rhIL-4 can be increased as high as 98% with higher biological activity when two steps of purification were employed by using

the combination of ion exchange and gel-filtration chromatographies.

**Key words** rhIL-4, purification, ion exchange

## 1993~1994 年度中国生物化学核心期刊

张 晓 加

(中国科学院上海文献情报中心, 上海 200031)

**关键词** 核心期刊, 生物化学, 引文法

我国 1986~1990<sup>[1]</sup>和 1990~1992<sup>[2]</sup>年度生物化学核心期刊已有报道,《生物化学与生物物理进展》、《生物化学与生物物理学报》和《生物化学杂志》均排在核心期刊的前三位. 本文以这三种期刊为统计源,对其 1993~1994 年

度论文引用中文期刊的情况进行统计, 中文刊共被引 1182 次, 涉及中文专业期刊 200 种. 因统计源具有典型的学科代表性, 所以被引频次较高的期刊可作为生物化学的中文核心期刊. 统计结果见表 1.

表 1 1993~1994 年度中国生物化学核心期刊表

| 序号 | 期刊名称        | 被引<br>频次 | 引文率<br>/% | 累积引文率<br>/% | 序号 | 期刊名称         | 被引<br>频次 | 引文率<br>/% | 累积引文率<br>/% |
|----|-------------|----------|-----------|-------------|----|--------------|----------|-----------|-------------|
| 1  | 生物化学与生物物理学报 | 205      | 17.34     | 17.34       | 9  | 实验生物学报       | 16       | 1.35      | 56.59       |
| 2  | 生物化学杂志      | 160      | 13.54     | 30.88       | 10 | 生理科学进展       | 16       | 1.35      | 57.94       |
| 3  | 生物化学与生物物理进展 | 119      | 10.07     | 40.95       | 11 | 中国医学科学院学报    | 15       | 1.27      | 59.21       |
| 4  | 中国科学 B 辑    | 45       | 3.80      | 44.75       | 12 | 军事医学科学院院刊    | 14       | 1.18      | 60.39       |
| 5  | 生物物理学报      | 44       | 3.72      | 48.47       | 13 | 植物生理学报       | 12       | 1.02      | 61.41       |
| 6  | 科学通报        | 37       | 3.13      | 51.60       | 14 | 中华医学检验杂志     | 11       | 0.93      | 62.34       |
| 7  | 生物工程学报      | 23       | 1.95      | 53.55       | 15 | 中华微生物学和免疫学杂志 | 11       | 0.93      | 63.27       |
| 8  | 北京医科大学学报    | 20       | 1.69      | 55.24       | 16 | 微生物学报        | 10       | 0.85      | 64.12       |

由表 1 可见, 这 16 种期刊占被引中文刊总数的 8.0%, 累积引文率为 64.12%, 可以覆盖 64% 以上的中文引文量, 因而可确定为中国生物化学的核心期刊. 前 3 种期刊的被引量之和占被引总量的 40% 以上, 是核心期刊的主体, 这与文献 [1] 和 [2] 用文摘法统计的结果相吻合.

## 参 考 文 献

- 1 李成建, 柯银花, 张新德等. 生物化学与生物物理进展, 1992; 19 (2): 163
- 2 刘翊鹏, 钟爱芳. 生物化学与生物物理进展, 1993; 20 (5): 404