

聚肌胞的制备

(二) 聚肌胞的合成

黎高沃 李楠茜 李幼华

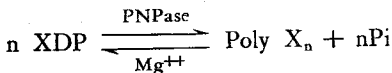
(中国科学院生物物理研究所二室)

雷珍妮 宋穗梅 刘同昌*

(广东江门甘蔗化工厂生化制药车间)

我们制备干扰素诱导剂——聚肌胞 (Poly I: C) 采用多核苷酸磷酸化酶 (PNPase) 的酶促合成法。

核糖核苷二磷酸 (XDP), 在镁离子存在下, 经 PNPase 的酶促作用, 生成多聚核苷酸 (Poly X) 并释放出无机磷 (Pi)。其反应是:



胞嘧啶核苷二磷酸 (CDP), 或次黄嘌呤核苷二磷酸 (IDP), 在上述条件作用下, 得到单链聚胞苷酸 (Poly C) 或聚肌苷酸 (Poly I)^[1,2]。在一定离子强度、温度条件下, 两种单链等克分子按碱基配对, 形成双股螺旋的聚肌胞^[3]。

材料和方法

一、CDP 的分离纯化

氧化磷酸化法生产 CTP 的副产物——CDP

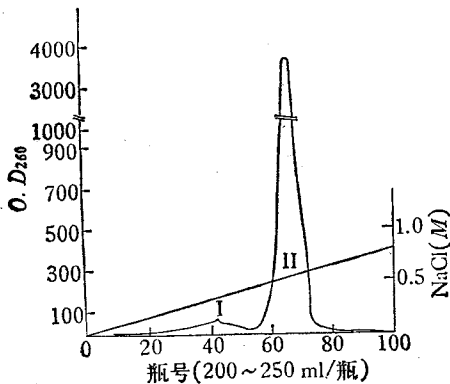


图1 CDP 柱层析曲线图

I——CMP II——CDP

粗制品, 还含有 CMP 和少量 CTP。因此, 要得到纯度较高的 CDP, 须分离纯化。

离子交换柱层析分离纯化^[4] 聚苯乙烯——二乙烯苯季胺型强碱性阴离子交换树脂 (100—200 目, 全交换量 3.5 毫克当量/克干树脂, 交联度 1×8) Cl-型。0.01M NaCl—0.8M NaCl, 0.01N HCl 线性梯度洗脱 (图 1、图 2)。

收集的 CDP 溶液调 pH 至 2.5, 加入三倍体积预冷无水乙醇, 4℃ 放置过夜。沉淀用预冷无水乙醇研磨脱水, 乙醚洗涤, 抽滤, 真空干燥, 即得紫外吸收含量为 91%, 纸电泳纯度为 82.8% 的 CDP-Na₂O。

二、IDP 的制备

1. ADP 的分离纯化 氧化磷酸化法生产 ATP 的副产物 ADP 粗制品, 同样需要分离纯化。

离子交换柱层析分离纯化^[4]。

柱层析条件与 CDP 柱层析相同 (图 3)。

经分离纯化, 能得到紫外吸收含量为

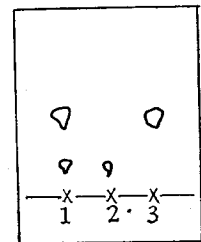


图2 CDP 柱层析后纸电泳图谱

1.——上柱液 2.——峰 I 3.——峰 II

* 参加这项工作的还有周润、蔡金盛、伍雪萍同志。

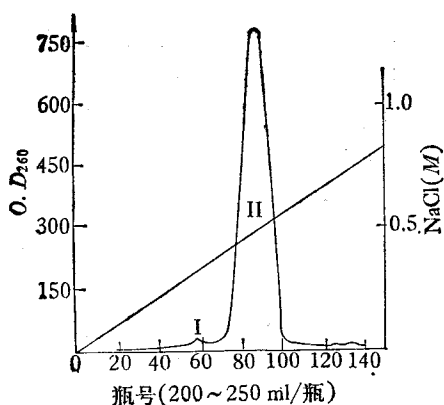


图3 ADP 柱层析曲线图

I——AMP II——ADP

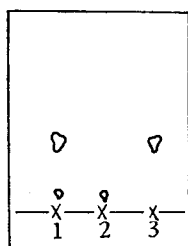


图4 ADP 柱层析后纸电泳图谱

1.——上柱液 2.——峰 I 3.——峰 II

96.5%，纸电泳纯度为 81% 的 ADP- Na_2 (图 4)。

2. ADP 脱氨法制备 IDP IDP 的制备有发酵法^[5]，有机合成法^[6]和 ADP 脱氨法^[7,8]。我们选用最简便的 ADP 亚硝酸脱氨法。

纸电泳纯度为 80% 的 ADP 溶于蒸馏水，加入固体 NaNO_2 ，用冰醋酸调 pH 至 3.5，25°C 水浴中反应二小时后，pH 高于 4.0 需用冰醋酸调回至 3.5，继续反应。八小时左右，反应液在柠檬酸缓冲液系统，进行纸电泳检查 (图 5)，90% 以上 ADP 完全脱氨。然后，用饱和 LiOH

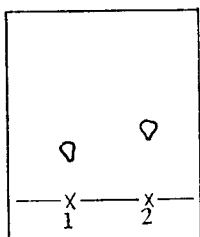


图5 ADP 脱氨制备 IDP 纸电泳图谱

1. ADP 2. IDP

调反应液 pH 至 7.0，加入三倍体积预冷无冰乙醇，使 IDP 沉淀，4°C 静置过夜。制备得到电泳纯度为 80% 以上的 IDP 干粉。重量产率为 94%。

IDP 在 pH2.0 时，其紫外最大吸收处波长 λ_{max} 在 249nm，最小吸收处波长 λ_{min} 为 223nm。

三、Poly C 和 Poly I 的酶促合成

合成 Poly C 和 Poly I 的反应体系中每毫升含有：CDP (或 IDP) 60 mM、 MgCl_2 (或 MnCl_2) 30 mM， CuSO_4 mM，尿素 300 mM，Tris-HCl (pH9.0) 300 mM、PNPase 2 单位。

37°C 保温六小时左右。反应过程中，随时用奥氏粘度计测定反应液的相对粘度，同时测定紫外吸收转化率。当相对粘度达最大值，转化率到稳定状态，应立即终止反应 (图 6)。为了获得相当大分子量的 Poly C 和 Poly I，其转化率分别控制在 60% 和 50%。在 pH7.0 时，Poly I 的 λ_{max} 在 248，Polyc 的 λ_{max} 在 268。

$$\text{转化率} = \frac{\text{反应在零时和不同时间聚合物的 } \lambda_{\text{max}} \text{ 读数之差}}{\text{零时聚合物的 } \lambda_{\text{max}} \text{ 读数}} \times 100\%$$

反应毕，离心去除沉淀物。然后，用酚抽提法除掉酶蛋白。经透析去除未聚合的核苷酸、乙醇沉淀法收集 Poly C (或 Poly I)、Poly C 和 Poly I 的重量产率分别为 60% 和 50%。

四、Poly I: C 的合成

Poly I 与 Poly C 按等克分子称量 (IMP 残基分子量 332.2，毫克分子消光系数 ϵ_{248} 7.6×10^3 ；CMP 残基分子量 305.2，毫克分子消光系

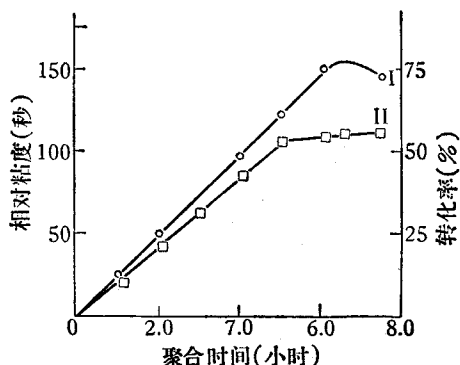


图6 PolyI 反应液在不同时间的相对粘度和转化率曲线

I——相对粘度曲线 II——转化率曲线

数 $\varepsilon_{268} 6.3 \times 10^3$)。分别溶于 0.15 M NaCl—0.006M 磷酸盐缓冲液 (pH7.4)。等体积混合, 45°C 间断摇动保温 30 分钟以上。然后, 每毫升体积加入 1000 单位卡那霉素。

所制得的 Poly I:C 分子量用沉降系数表示, 为 8s—10s。

结果和讨论

此法生产的 Poly I:C, 经无菌处理, 装成针剂, 已用于临床。外用滴眼或在结膜下注射, 治疗单纯性疱疹角膜炎^[9,10]肌肉注射治疗带状疱疹, 疗效显著, 无毒性^[11], 滴鼻治慢性过敏性鼻炎, 注射治疗乙型肝炎以及某几种癌症, 有改善症状的效果^[11]。

PNPase 酶促聚合所用的 CDP 或 IDP, 其来源除 Moffatt-Khorana 法^[12], 经二环己羧二亚胺 (DCCI) 缩合剂进行有机合成外; 还可以从光磷酸化法或氧化磷酸化法生产 CTP 和 ATP 的副产物中, 经离子交换柱层析分离纯化得到 CDP 和 ADP。我们用的是氧化磷酸化法生产 CTP 和 ATP 的副产品, 可以降低聚肌胞的生产成本。

CDP 和 ADP 的分离纯化方法简便。经离子交换柱层析纯化的两种材料, 重量收率达 80% 左右, 产品的纸电泳纯度均在 80% 以上。用 NaCl 梯度洗脱, 峰形较锐, 可直接沉淀, 无需真空加温浓缩, 避免了产品磷酸基团的脱落, 适于工厂采用。

亚硝酸脱氨法制备 IDP, 无需特殊设备; 反应过程控制 pH 在 3.5, 就可得到 90% 以上的转化率, 所得 IDP 的纯度在 80% 以上, 达到聚合要求。

参考实验室用 PNPase 酶促核苷二磷酸聚合的条件, 维持反应液的 pH 值不变, 加入激活 PNPase 的 Mg^{++} 或 Mn^{++} 取得的效果, 同时为工业生产作了提高激活效力的改进, 如用 Cu^{++} 抑制杂酶(主要是核糖核酸酶), 提高 Tris-HCl 的浓度, 加大了缓冲能力, 使反应液维持在 PNPase 的最适 pH9.0; 反应产生的 P_i 在碱性条件下, 不断与 Mn^{++} 生成 $MnHPO_4$ 沉淀, 都取得了有利于聚合反应的结果。Poly C 和 Poly I 的聚合产率分别为 60% 和 50%。

PNPase 酶促聚合核苷二磷酸时, 根据粘度和转化率控制反应的进行, 使聚合产物的分子达到一定的大小, $Poly I \geq 5s$; $Poly C \geq 3s$, 制备的 PolyI:C 为 8—10s。

参考文献

- [1] Heppel, L. A. et al.: *J. B. C.*, **229**, 679, 1957.
- [2] Basilio, C. et al.: *Methods of Enzymology*, Academic Press, New York. Vol. **VI**, 713—718, 1963.
- [3] Hilleman, M. R. et al.: *Scientific American*, **225**, 26, 1971.
- [4] 中国科学院微生物研究所: 《核苷酸类物质的生产和应用资料汇编》, 1971 年, 第 14 页。
- [5] 日本特许公报, 昭 47-3, 153; CA.76 p189046g, 1972.
- [6] 日本特许公报, 昭 46-21, 587; CA. 75, p 130076p 1971.
- [7] Michelson, A. M. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, **91**, 92, 1964.
- [8] 中国科学院上海生物化学研究所东风生化试剂厂: 《生物化学与生物物理进展》, 1977 年, 第 6 期, 15 页。
- [9] 中山医学院眼科医院: 《广东省参加中华医学会眼科专题讨论文集》, 1978 年。
- [10] 佛山市人民医院眼科: 《广东省医药参考资料》, 1979 年, 第 1 期, 第 6 页。
- [11] 1979 年广东省聚肌胞鉴定会临床报告资料 (未发表), 1979 年。
- [12] Khorana, H. G., et al.: *J. Amer. Chem. Soc.*, **89**, 2154, 1967.

[本文于 1980 年 4 月 28 日收到]

新 期 刊 介 绍

《核电子学与探测技术》报道我国核仪器、核电子学及探测技术方面的科研成果, 介绍新技术、新产品、国际标准及学术活动等。中国核学会、中国电子学会

所属核电子学与核探测技术专业学会主办, 原子能出版社出版, 新华书店发行。