

人 β -干扰素粗制品的浓缩与纯化

李成文 邵军石 吴本传 李 红

(军事医学科学院微生物流行病学研究所)

提 要

本文报道了采用 Millipore 超滤膜浓缩人 β -干扰素粗制品, 滤速快, 活性回收率高, 同时又具有一定地纯化作用。浓缩后的干扰素样品, 再经过一次蓝色葡聚糖——Sepharose CL-6B 柱层析, 可将其纯化 2800 倍, 特异活性可达 $10^6 \mu/\text{mg}$ 蛋白以上的国际临床标准。

人 β -干扰素是一种具有广谱抗病毒作用、生物活性极高(一毫克蛋白活力至少有 10^{10} 单位)^[1] 又不稳定的小分子糖蛋白。目前所生产的人 β -干扰素粗制品, 一般活力低而含杂蛋白多, 须浓缩和纯化才适宜临床应用。

关于人 β -干扰素粗制品的浓缩和纯化技术, 近几年来国外文献不少, 国内虽也有个别单位从事研究, 但尚未见报道。我们采用低温高速离心及超滤浓缩技术, 不仅速度快、活性回收率高, 还可以去除部分杂蛋白。浓缩后人 β -干扰素粗制品的纯化, 参考 Knight 等人的蓝色葡聚糖-琼脂糖凝胶层析 (Blue Dextran Sepharose CL-6B, 简称 BDS) 方法^[2], 并对其操作条件作了部分改进, 所得产品特异活性的纯化倍数达 2800 倍以上, 质量达到了国际临床级标准(一毫克蛋白含 10^6 单位干扰素活性), 干扰素活性回收率为 63.8%。现将实验方法与结果报告如下:

材 料 和 试 剂

人 β -干扰素粗制品系本所干扰素组提供, 一批干扰素活性高低不一, 详见表 1 和表 2。抗人血清、兔抗 BSA 血清为本组 84 年制备。超滤膜为美国 Millipore 公司产, 孔径分别为

0.025 μm , 0.05 μm 和 0.1 μm 三种。超滤器是本院工厂制造。有效滤膜面积为 39cm^2 。BDS 为 Pharmacia Fine Chemicals 产。

方 法 与 程 序

1. 人 β -干扰素粗制品的超滤浓缩

将粗制人 β -干扰素样品, 从低温冰箱取出置室温水浴化冻, 2°C 每分钟 10,000 转离心 20 分钟, 去除细胞碎片及变性蛋白, 然后用孔径为 0.025 μm 的超滤膜, 以 $3\text{kg N}_2/\text{cm}^2$ 压力, 于 2°C 冷箱中浓缩 10 倍左右。

2. 人 β -干扰素的 BDS 层析纯化

称取 10 克 BDS 干粉, 用 PB 充分溶胀后约 40ml 体积, 装成 $1.5 \times 12.5\text{cm}$ 和 $1.5 \times 9.5\text{cm}$ 柱子两根; 用 0.02 M pH 7.2 PB 充分平衡。将用 PB 平衡后的浓缩粗制样品上柱, 流速每分钟 0.2 至 0.5ml, 随后柱子置 4°C 下 2 小时, 先用上述 PB 洗下第一蛋白峰(杂蛋白)。待 $\text{OD}_{280\text{nm}}$ 紫外监测洗脱峰至基线, 再用同一 PB 含有 50% 乙二醇 (EG) 和 1M NaCl 洗下第二个杂蛋白峰, 在该峰尾部含低活性的干扰素。此时开始分管收集, 五分钟一管, 约收集 30 管。如所加样品在 50ml 左右, 可用小柱子, 如 80ml 左右 (10^7 单位) 须用大柱子, 收集 50 管左右。全部

操作均在 4℃ 下进行。

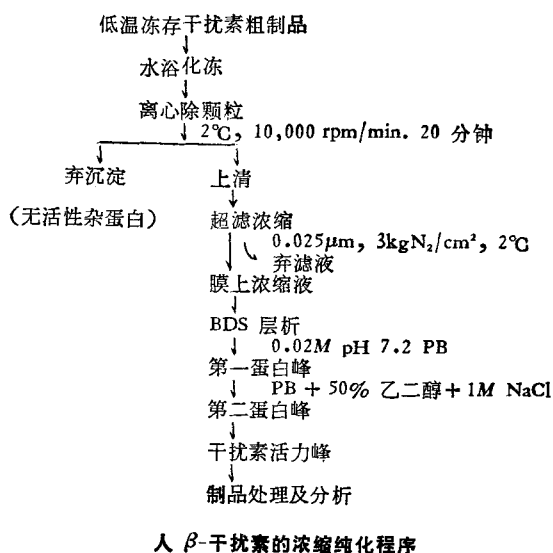
3. 干扰素活性的测定及生化分析

活性测定采用微量板染色法^[3]。纯化前后干扰素样品均用聚丙烯酰胺凝胶电泳^[4]作蛋白分析,以 SDS-PAGE^[5]测定蛋白分子量,以柱状聚焦电泳^[6]测等电点,单向免疫扩散抗原成分分析及紫外吸收法蛋白浓度定量^[7]。

4. 纯化人 β -干扰素的处理与保存

纯化后的人 β -干扰素样品生物活性较高,而蛋白浓度很低,且含有约 40% 的乙二醇,需用超过滤去除后,立即加入 3mg/ml 的人血浆血蛋白作为保护剂,再于 -70℃ 低温保存。

上述操作过程归纳如下:



实验结果

1. 人 β -干扰素粗制品的浓缩

实验中先后采用了抗 BSA 非特异亲和吸附剂吸附、不同饱和度的硫酸铵盐析及不同孔径的超滤膜浓缩等方法,结果证明用超滤浓缩,不仅操作简单滤速快,同时又可进一步纯化。根据不同孔径超滤膜的浓缩效果大小,选用孔径为 0.025 μm 的滤膜效果较好,平均流速为每小时 60 至 100 ml,干扰素回收率平均为 87.73%,结果见表 1 和表 2。

此外,在浓缩 10,000ml 以上粗制干扰素过程中,以牛血清白蛋白和猪胃蛋白酶为模样品,观察了超滤中压力大小与滤速呈正比,同蛋白截止率呈反比的关系;样品的蛋白浓度越高而滤速降低,膜上蛋白截止率变高。根据超滤膜的性能及超滤膜器的特点,选择了氮压力为 3 kg/cm²,一般样品浓缩十倍左右的件效果较佳。关于压力大小、蛋白浓度高低滤速和蛋白截止率的影响见图 1 至图 4。

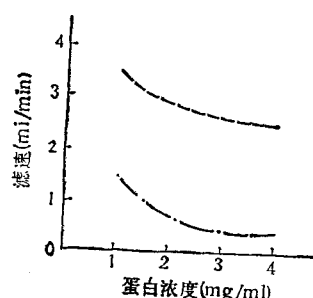


图 1 蛋白浓度对滤速的影响

--- 牛血清白蛋白 — 胃蛋白酶

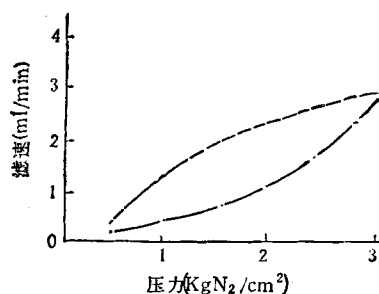


图 2 压力对滤速的影响

图注同图 1

2. 人 β -干扰素的纯化结果

从表 3 和图 5 表明,用 BDS 层析纯化人 β -干扰素粗制品,简单快速又纯化倍数高。先后进行了四批纯化实验,产品最高比活性纯化倍数达 2800 以上,干扰素比活性均到 10⁶ μ/mg 蛋白,干扰素活性回收率平均为 63.8%。干扰素

表 1 不同方法对人 β -干扰素浓缩效果的比较

方 法	条 件	回收率%	备 注
硫酸铵盐析	饱和度 20%	20.1	脱盐慢
	饱和度 45%, 60%	25.4	脱盐慢
	饱和度 60%, 80%	44.5	脱盐慢
超滤法	孔 径 $0.1\mu\text{m}$	32.0	孔径大
	$0.05\mu\text{m}$	54.0	孔径大
	$0.025\mu\text{m}$	95.1	阻留大部干扰素
硫酸铵-超滤	20%, $0.025\mu\text{m}$	24.3	盐析中损失
	25%, $0.025\mu\text{m}$	58.5	盐析中损失

表 2 人 β -干扰素的超滤浓缩结果

批 号	浓 缩 前			浓 缩 后				
	体 积 (ml)	活 性 ($\mu\text{g/ml}$)	总 活 性 (μ)	体 积 (ml)	活 性 ($\mu\text{g/ml}$)	总 活 性 (μ)	纯化倍数	回收率 (%)
1	260	197	5.1×10^4	32.0	1540	4.9×10^4	3.5	96.1
2	72	8,150	5.9×10^3	12.0	46652	5.6×10^3	3.3	94.9
3	86	19,767	1.7×10^6	22.0	50,000	1.1×10^6	10.0	64.7
4	1050	5,047	5.3×10^6	110.0	43,636	4.8×10^6	1.3	90.6
5	1000	2500	2.5×10^6	86.5	25,434	2.2×10^6	2.3	88.0
6	2000	3150	6.3×10^6	202.0	28712	5.8×10^6	2.1	92.1
合计	4468			464.5				平均 87.73

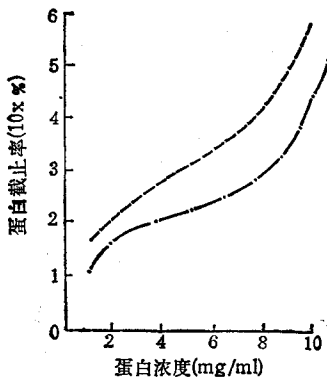


图 3 蛋白浓度与截止率的关系
图注同图 1

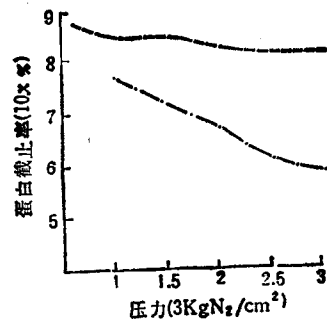


图 4 压力对蛋白截止率的影响
图注同图 1

活力峰位于第二个杂蛋白峰的尾部之后，一般可在蛋白吸收峰降至基线时再收集 30 至 50 管为干扰素样品。

3. 纯化前后人 β -干扰素的分析

人 β -干扰素粗制品浓缩纯化的各步样品，除了总蛋白浓度的紫外吸收定量测定外，还作

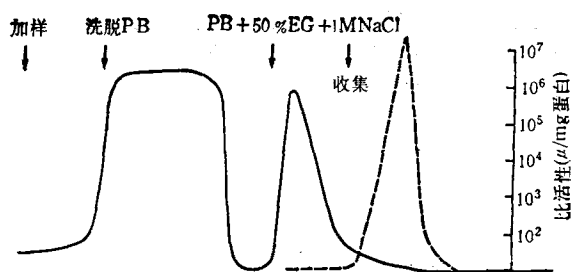


图5 人 β -干扰素的BDS层析
—— 蛋白吸收峰 ---- 干扰素活力峰

了PAGE、SDS-PAGE、等电聚焦电泳及免疫单向扩散BSA的定量等。电泳结果表明,纯化样品的纯度明显提高;纯化前含BSA一种杂蛋白在1mg/ml左右,而纯化后只含有10—50 μ g/ml;还初步对SDS-PAGE胶柱中干扰素活性作了测定,胶中分子量20,000左右,具有较高的干扰素活性,此结果同Knight报告相符。

讨 论

在人 β -干扰素粗制品的纯化技术中,蓝色葡聚糖-琼脂糖凝胶层析是目前被认为操作简

表3 人 β -干扰素的BDS层析纯化结果

批号	粗 制 HuIFN- β			纯 化 HuIFN- β				
	体 积 (ml)	活 性 (μ /ml)	比 活 性 (μ /mg, 蛋白)	体 积 (ml)	活 性 (μ /ml)	比 活 性 (μ /mg, 蛋白)	纯化倍数	回收率 (%)
1.	3800	3,493	1481.5	41	14285	1.4×10^6	957.9	44.12
2.	1000	4,768	1978.4	37	108426	5.7×10^6	2881.1	84.13
3.	12.5	24,776	8461.2	11.5	25074	2.5×10^6	295.5	93.1
4.	1030	10,000	5617.8	14.9 23.2	100000 85000	1.0×10^7 5.1×10^6	1780.1 907.8	14.5 } 33.9* 19.4 }

33.9% 仅计算 $10^6 \mu$ /mg 蛋白以上的样品的回收率,比活性在 $10^6 \mu$ /mg 蛋白以下者样品未计算之内。

单、效果较好的方法之一。1980年Knight^[2]用此法首先将人 β -干扰素纯化500倍,次年又用大小两个BDS柱子,将人 β -干扰素纯化了2941倍,特异活性达 $5 \times 10^8 \mu$ /mg蛋白^[3]。同年Stanley等^[9]报道了纯化人 β -干扰素1000倍,特异活性为 $1 \times 10^7 \mu$ /mg蛋白的结果。Kenny^[10]等用BDS方法也获得 $1.1 \times 10^8 \mu$ /mg蛋白的制品。我们参考Knight 1981年的方法,结合超滤浓缩及层析条件的改进,也得到了纯化2800倍、特异活性达到 $1 \times 10^7 \mu$ /mg蛋白的人 β -干扰素制品。

人 β -干扰素的生物活性测定,近几年虽已报告用单克隆抗体进行放射免疫测定^[11],也仅是个别实验室内应用,国内外从事人 β -干扰素

研究和生产的单位,主要使用细胞病变抑制染色法。由于该法受细胞生长、攻击病毒毒力强弱及培养条件等多种因素的影响,造成测定结果稳定性差,波动较大,甚至有时出现回收率大于100%的现象。如Kenny等用BDS层析纯化人 β -干扰素的回收率为106%和167%,上海生物制品研究所纯化人 α -干扰素时也有大于100%的回收率。我们在超滤浓缩人 β -干扰素粗制品,也曾有四次实验的结果,干扰素活性回收率大于100%。

人 β -干扰素是一种十分不稳定的小分子糖蛋白,特别是在纯化状态下更易失活,除在层析中用含有50%的乙二醇和在纯化制品加入3mg/ml的人白蛋白作为保护外;整个操作过程

一步纯化胰岛素单克隆抗体

任 浏 沈晶晶 陈晓穗 吕 植

(海军总医院中心实验科, 北京)

提 要

本文报道用瑞典 Pharmacia 公司生产的快速蛋白液相层析仪、强阴离子交换预装柱 (MonoQ) 一步纯化胰岛素单克隆抗体的方法, 结果证明此法快速、简便、重复性和分离效果好。纯化后的单克隆抗体的免疫活性仍在 94% 左右。

因单克隆抗体 (McAb) 主要来源于细胞培养的上清液或动物的腹水, 所以, 它们在不同程度上混杂非抗体蛋白及脂类物质等, 为消除实验中的一些非特异结合或干扰, 必须对其进行纯化。我们用瑞典 Pharmacia 公司生产的快速蛋白液相层析仪 (简称 FPLC) 建立了一种快速、简便、重复性和分离效果好的一步纯化胰岛素 McAb 的方法。

一、材料和方法

1. 材料

1) 抗体: 胰岛素 McAb, 属 IgG₁ 亚型, 本实验室建株。

中尽可能地作到低温、快速及减少理化因素的破坏作用。此外, 实验中还观察到, 人 β -干扰素粗制品的活性高低、杂蛋白含量的多少, 直接影响纯化后产品的特异活性和回收率的大小。因此, 最好使用生物活性较高, 而总蛋白浓度又低的制品, 或者将生物活性高低悬殊较大的样品分别纯化。

2) 三羟基氨基甲烷 (Tris): 含量不少于 98.5%, Fluka 进口分装。

3) Ampholine: pH 3.5—10 (瑞典 LKB 公司)。

4) Multiphore-2117 等电聚焦电泳仪: 同上。

5) LCC-500 FPLC: 瑞典 Pharmacia 公司。

6) MonoQ 柱: 强阴离子交换预装柱 (0.5 × 10 厘米) 同上。

2. 方法

1) 胰岛素 McAb 的纯化: 取杂交瘤腹水, 4℃ 离心, 取上清 1:1 稀释, 然后经 Millipore 滤

73, 1983。

[5] 李成文等: 军事医学科学院微生物流行病学研究所, 科研工作年报, 110—116, 1980。

[6] 李成文等: 军事医学科学院微生物流行病学研究所, 科研工作年报, 200—203, 1983。

[7] 李成文等: 《军事医学科学院院刊》, [3], 325—328, 1983。

[8] Knight, Jr. E. et al.: *J. Biological Chemistry*, 256 (8), 3609—11, 1981。

[9] Friesen, H. J. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 206, 403, 1981。

[10] Kenny, C. et al.: *Methods in Enzymology*, 78, PtA, 435—441, 1981。

[11] Inoue, M. et al.: *Infection and Immunity*, 33(3), 763—768, 1981。

参 考 文 献

[1] Gresser, Ion.: *Interferon 2*, p 2, Academic Press, 1980。

[2] Knight, Jr. E. et al.: *Science*, 207(4430), 525, 1980。

[3] 肖成祖等: 《军事医学科学院院刊》, [3], 353, 1983。

[4] 李成文等: 《生物化学与生物物理进展》, [6], 71—

[本文于 1986 年 9 月 29 日收到]